

Untersuchungen zur carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin in der G₁ und S-Phase des Leberzellzyklus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sabina Rink

aus Hildesheim

München 1986

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Direktor:

Professor Dr. med. M. Eder

UNTERSUCHUNGEN ZUR CARCINOGENEN WIRKUNG
VON DIÄTHYLNITROSAMIN IN DER
G₁- UND S-PHASE DES LEBERZELLZYKLUS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sabina Rink
aus Hildesheim

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. M. Rabes
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. M. Eder
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	22. Mai 1986

Herrn Professor Dr. Rabes danke ich sehr herzlich für die Themenstellung, Anleitung und Beratung bei dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Frau Wendt, Frau Sickert und Frau Metzger für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente und der Herstellung der histologischen Präparate.

Frau Döhle und Herrn Hampe danke ich für die fototechnische Bearbeitung.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, durchgeführt.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATPase	=	Adenosin-Triphosphatase
DÄNA	=	Diäthylnitrosamin
DNS	=	Desoxyribonucleinsäure
EDB	=	Enzymdefektbezirk
GGT	=	Gamma-Glutamyl-Transpeptidase
G ₀	=	Phase proliferativer Ruhe
G ₁	=	Präsynthetische Phase
G ₂	=	Postsynthetische, prämitotische Phase
³ H-TdR	=	Tritium-markiertes Thymidin
HE	=	Hämatoxylin-Eosin
HU	=	Hydroxyharnstoff
M	=	Mitosephase
MI	=	Markierungsindex
MNU	=	Methylnitrosoharnstoff
PB	=	Phenobarbital
PH	=	Partielle Hepatektomie
RNS	=	Ribonucleinsäure
S	=	DNS-Synthesephase
SE	=	Standardfehler

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A.	EINLEITUNG	1
B.	EXPERIMENTELLER TEIL	13
1	Versuchstiere	13
2	Bildung der Versuchsgruppen	13
3	Versuchsbeschreibung	13
4	Material und Methodik	17
4.1	Partielle Hepatektomie	17
4.2	Hydroxyharnstoff-Infusion	17
4.3	Diäthylnitrosamin-Injektion	18
4.4	Phenobarbitaldauerfütterung	18
4.5	Kontrollen	19
5	Auswertung des Hauptversuchs	19
5.1	Tötungszeitpunkt und Aufbereitung der Leber	19
5.2	Herstellung der enzymhistochemischen Präparate	20
5.3	Auswertung der enzymhistochemischen Präparate	26
6	Vergleichsfärbungen von Serienschnitten	28
6.1	^3H -TdR-Pulsmarkierung	28
6.2	Herstellung der Präparate	28
6.3	Autoradiographie	29
6.4	Auswertung der Serienschnitte	29
7	Biologischer Versuch	30
C.	ERGEBNISSE	31
1	Hauptversuch	31
1.1	Ergebnisse des Hauptversuchs	31
1.2	Statistische Auswertung der Ergebnisse	43
1.3	Größenverteilung der Enzymdefektbezirke in den einzelnen Auswertungseinheiten	46

2	Ergebnisse der Untersuchungen an Serienschritten	52
2.1	Vergleich ATPase - Glucose-6-Phosphatase-Reaktion	52
2.2	Vergleich ATPase-Reaktion - Autoradiographie	52
3	Biologischer Versuch	56
3.1	Überlebenszeiten und Todesursachen der Tiere des Biologischen Versuchs	56
3.2	Histologie der Tumoren	60
D.	DISKUSSION	61
E.	ZUSAMMENFASSUNG	72
F.	LITERATURVERZEICHNIS	74
	LEBENS LAUF	88

A. EINLEITUNG

Menschliche wie auch tierische Zellen entwickeln sich während der Ontogenese von pluripotenten Stammzellen zu hochdifferenzierten Zellen. Die Entstehung maligner Tumoren kann man als gegenläufigen Prozeß betrachten, an dessen Ende eine mehr oder weniger undifferenzierte Zelle steht, die von den normalen Regulationsmechanismen unabhängig ist und autonomes Wachstum zeigt.

Von der Carcinogenexposition bis zur Ausbildung makroskopisch sichtbarer Tumoren vergehen unter normalen Umständen Monate bis Jahre, in denen, wenn überhaupt, nur mikroskopisch sichtbare Veränderungen festzustellen sind. Im Tierversuch läßt sich diese "präneoplastische Phase" unter bestimmten Bedingungen auf einige Monate verkürzen und soll hier am Beispiel der Rattenleber untersucht werden.

In der intakten Leber adulter Ratten entstehen unter normalen Umständen selten Carcinome, und auch nach einmaliger Carcinogenexposition kommt es häufiger zur Tumorentstehung in der Niere als in der Leber (Magee und Barnes, 1962; McLean und Magee, 1970; Montesano et al., 1979). Hepatome entstehen erst nach einem Proliferationsreiz, wie ihn zum Beispiel die partielle Hepatektomie (PH) darstellt.

Deshalb kam man zu dem Schluß, daß Carcinogene Schäden am Genom verursachen, die normalerweise reparabel sind. In proliferierenden Geweben jedoch führen nachfolgende DNS-Synthesen durch Weitergabe der Schäden an die Tochterzellen zur genetischen Fixierung und damit zu irreversiblen Läsionen (Craddock und Frei, 1974; Rabes, 1979; Emmelot und Scherer, 1980; Columbano et al., 1981).

Es ist bekannt, daß auch beim Menschen ein erhöhter Zellumsatz zur Entstehung von Leberneoplasmen erforderlich ist, wie dies z. B. bei Leberzirrhose oder chronischer Hepatitis der Fall ist (Rabes et al., 1983).

Parenchymatöse Organe wie Leber und Niere gehören zu den stabilen Elementen mit einer Mitoserate von 1 bis 2 auf 10.000 Zellen (Altmann, 1966). Dennoch gehört die Leber zu den regenerationsfähigsten Organen. Diese Tatsache scheint im Widerspruch zu der von Schmalhausen (1928) aufgestellten Regel zu stehen, nach der die zunehmende Differenzierung einer Zelle eine Abnahme der Regenerationsfähigkeit bedingt. Nachdem man aber festgestellt hatte, daß nach einer Zweidrittelhepatektomie der Ratte die Leber bereits nach zwei bis drei Wochen ihr ursprüngliches Gewicht wieder erreicht hat (Higgins und Anderson, 1931), wurde der Begriff der fakultativ postmitotischen Zelle geprägt (Cowdry, 1942). Die Leber ist imstande, auf einen Parenchymverlust mit einer Proliferationssteigerung im Sinne einer kompensatorischen Hyperplasie zu reagieren (Bucher, 1962). Dabei werden die S-, G₂- und M-Phase um den Faktor 2 verkürzt, gleichzeitig verdoppelt sich die DNS-Syntheserate (Stöcker, 1966).

Die Proliferation verläuft vom Zeitpunkt der PH an nach Art einer gedämpften Schwingung, und geht im weiteren Verlauf der Regeneration immer mehr in den normalen diurnalen Rhythmus über (Altmann, 1966; Klinge und Mathyl, 1968). Der erste und höchste DNS-Synthesegipfel liegt bei 20 - 24 Stunden, 40 Stunden nach PH lassen bereits 93 % aller Kerne Zeichen einer durchlaufenen DNS-Synthese erkennen (Altmann, 1966). Die Hepatozyten treten also nicht gleichzeitig, sondern gestaffelt, und zwar je nach Lage im Lobulus, in die Proliferationsphase ein (Tuczek und Rabes, 1973).

Um die Carcinogenempfindlichkeit in Abhängigkeit vom Zellzyklus exakt beurteilen zu können, ist es nötig, den Ablauf der Regeneration mit Hilfe von Zytostatika, wie z. B. Hydroxyharnstoff (HU), zu synchronisieren.

Die Hauptwirkung des Hydroxyharnstoffs besteht darin, daß es den Übergang von der G₁-Phase zur S-Phase reversibel blockiert, indem es den Einbau von Thymidin in die DNS durch Hemmung der Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase verhindert (Schwartz et al., 1965; Coyle und Strauss, 1970). Unmittelbar nach Absetzen einer HU-Infusion treten die Zellen ohne Zeichen einer Schädigung synchron in die erste DNS-Synthese-Phase ein (Bhuyan et al., 1973), die unter diesen Bedingungen im Vergleich zur normalen regenerierenden Leber verkürzt ist (Rabes et al., 1977).

Da HU auf die Synthese von RNS und Protein keinen Einfluß hat, kommt es während der Infusion zu einer ausgeprägten Zellhypertrophie, die man als "unbalanced growth" bezeichnet (Schmidkonz et al., 1977).

Wirkung und Toxizität des HU sind abhängig von Dosis und Expositionsdauer (Moran und Straus, 1979), außerdem von der Position der Zellen im Zellzyklus. Auf Zellen, die sich bereits in der S-Phase befinden, wirkt HU schon in niedrigen Dosierungen toxisch (Sinclair, 1967; Bhuyan et al., 1973). Außerhalb der S-Phase führt es erst bei sehr hohen Dosierungen und Expositionszeiten von mehr als 32 Stunden, also Zeiten, die über die Dauer eines normalen Zellzyklus hinausgehen, zum Zelltod (Moran und Straus, 1979).

Bei der Ratte führt eine 26stündige HU-Infusion im Anschluß an eine PH zur Akkumulation von 80 % der Hepatozyten an der G₁-S-Grenze (Rabes et al., 1977). Eine Infusionszeit von zehn Stunden, wie sie in dieser Arbeit gewählt wurde, er-

gibt ein gutes Ergebnis in bezug auf relativ hohen Synchronisationsgrad bei geringer Zytotoxizität (Rabes et al., 1986). Alleinige HU-Infusion in Verbindung mit PH führt nicht zur Entstehung von Lebertumoren oder präneoplastischen Veränderungen im Leberparenchym (Rabes et al., 1986).

Es gibt eine große Zahl von chemischen Verbindungen, die im Tierversuch, zum Teil auch beim Menschen, Krebs erzeugen. Zu diesen Verbindungen gehört die Gruppe der Nitrosamine. Ihre carcinogene Wirkung wurde 1956 von Magee und Barnes entdeckt, als nach Applikation von Dimethylnitrosamin bei der Ratte Nierentumoren auftraten.

Nitrosamine werden erst im Körper, in der Regel erst nach enzymatischer Aktivierung, in ihre carcinogene Wirkform umgewandelt (Craddock und Magee, 1963, 1966). Dabei entsteht über mehrere Zwischenstufen ein Carbonium-Ion, welches die eigentlich wirksame Substanz darstellt (Druckrey et al., 1966). Da die meisten Carcinogene eine gemeinsame Struktur vermissen lassen, scheint ihre Metabolisierung der Schlüsselfaktor für ihre Aktivität zu sein (Miller, 1978). Im Falle der enzymatisch aktivierten Carcinogene erklärt sich daraus auch deren Organotrophie bzw. die Tatsache, daß sie an Mikroorganismen keine mutagene Wirkung besitzen.

Nach Miller (1970) stellen chemische Carcinogene in ihrer Wirkform elektrophile Reagenzien dar, die mit nukleophilen Positionen an DNS, RNS und Proteinen reagieren, wobei der für die Cancerogenese initiale und entscheidende Schritt in der Reaktion mit der DNS zu bestehen scheint. Bei den Nitrosaminen handelt es sich dabei um eine Alkylierung von Purin- und Pyrimidinbasen, wobei verschiedene Alkylierungsprodukte entstehen. Bevorzugter Bindungsort ist das N 7 des Guanins. Größere Bedeutung für die maligne Initiation von Zellen hat offenbar jedoch das O⁶-Alkylguanin (Loveless, 1969), da dessen Vorkommen und Persistenz besser mit dem

Auftreten von Tumoren korreliert (Kleihues und Margison, 1974; Goth und Rajewsky, 1974).

O⁶-Alkylguanin kann bei der DNS-Reduplikation falsche Basenpaarungen bewirken, die wiederum eine Veränderung der genetischen Information in der neugebildeten DNS zur Folge haben können. Betrifft diese Veränderung Repressor- oder Strukturgene, kann es zu Fehlern in Funktion und Wachstumsregulation der Zelle kommen; beispielsweise könnte eine Veränderung eines Strukturgens zum Mangel an bestimmten Enzymen führen, eine Blockierung eines Repressorgens dagegen hätte möglicherweise eine Steigerung der RNS- und Proteinsynthese und damit unter bestimmten zusätzlichen Voraussetzungen vermehrtes Wachstum zur Folge. Außerdem führen Nitrosamine zu Einzelstrangbrüchen der DNS, die sich dann als carcinogen auswirken können, wenn sie falsch repariert werden (Bradley et al., 1982).

Als Standardcarcinogen zur experimentellen Erzeugung von Lebermalignomen kann Diäthylnitrosamin (DÄNA) betrachtet werden (Druckrey et al., 1967), das auch in dieser Arbeit verwendet wurde. DÄNA ist wie alle kurzkettigen Dialkylnitrosamine leicht wasserlöslich (Druckrey et al., 1961). Schon 24 Stunden nach Verabreichung ist es völlig metabolisiert (Magee und Lee, 1964), kumuliert also nicht im Fettgewebe und ist daher genau dosierbar (Friedrich-Frekxa, 1969). Bei relativ geringer Toxizität zeigt es eine hohe carcinogene Wirkung (Druckrey et al., 1967) und eine exakte Dosis-Wirkungs-Beziehung: Bei einer Gesamtdosis von ca. 800 mg/kg Körpergewicht sterben alle Versuchstiere nach ca. 160 Tagen an Carcinomen, wobei es sich überwiegend um hepatozelluläre Carcinome handelt (Friedrich-Frekxa et al., 1969).

Wie bereits erwähnt, wird die Tumorentstehung bei gesteigertem Zellumsatz verstärkt bzw. erst ermöglicht durch Fixierung des Schadens in der auf das Carcinogen folgenden S-

Phase. Damit wird die "initiated cell" zur "induced cell" (Columbano et al.).

Man hat in vitro festgestellt, daß die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Carcinogenen während der späten G₁-Phase und der S-Phase größer ist als in den übrigen Zellzyklusphasen (Bertram und Heidelberger, 1974). Diese Tatsache steht wahrscheinlich mit den Reparaturmöglichkeiten der Zelle an der DNS im Zusammenhang. Denn die absolute Menge an Alkylierungsprodukten, vor allem an O⁶-Alkylguanin, ist nicht in der S-Phase am höchsten, sondern in G₀ und G₁ und fällt während S- und G₂-M stark ab (Rabes, 1979). Man kann sich aber vorstellen, daß ein Schaden, der erst kurz vor der DNS-Replikation entsteht, trotz schnellerer Elimination des promutagenen O⁶-Alkylguanins während der DNS-Synthese (Rabes et al., 1982), aus rein zeitlichen Gründen nicht mehr repariert werden kann. "Je kürzer also das Intervall zwischen Läsion und DNS-Replikation ist, desto wahrscheinlicher ist einerseits eine Störung im Ablauf der DNS-Synthese, andererseits aber auch eine Fixierung eines promutagenen Schadens, falls die DNS-Synthese sozusagen rechtzeitig einen unreparierten Defekt überläuft" (Rabes, 1979).

Das spezifische Reparatursystem für O⁶-Alkylguanin funktioniert durch Übertragung des Alkylrests von Guanin auf Cystein über ein Protein, welches gleichzeitig die Reaktion katalysiert und den Alkylrest aufnimmt (Pegg et al., 1982). Von Versuchen mit Bakterien ist bekannt, daß dieses Alkyl-Acceptor-Protein nur einmal reagieren kann (Swenberg et al., 1982). Andere Autoren beschreiben das Reparaturenzym als De- oder Transalkylase (Pegg, Perry und Bennett, 1981) mit schneller Sättigung seiner Kapazität bei höheren Carcinogendosen (Rabes et al., 1982).

Neben der notwendigen enzymatischen Aktivierung von Carcinogenen ergibt sich auch aus diesen Reparaturmechanismen

eine hypothetische Erklärung für ihre Organotropie: Zielorgane können die Gewebe mit dem geringsten Gehalt an Reparaturenzymen sein, in denen die Reparatur der DNS relativ langsam abläuft (Kleihues und Margison, 1974).

Auch beim Menschen kommt es durch Umwelteinflüsse zur Exposition mit Nitrosaminen. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Methylnitrosoharnstoff durch Nahrung z. B. schätzt man auf 1,1 µg (Pegg et al., 1982). Jedoch ist zumindest in vitro die enzymatische Reparaturkapazität der menschlichen Leber ca. zehnmal größer als bei der Ratte (Pegg et al., 1982).

Nach Carcinogenexposition entwickelt sich das Malignom nicht in einem Schritt, sondern es folgt erst eine präneoplastische Latenzphase, die charakteristische Veränderungen aufweist. Nach Bannasch (1979) ist die Präneoplasie als eine Gewebsveränderung zu definieren, die selbst noch keinen offensichtlichen neoplastischen Charakter hat, jedoch schon erkennen läßt, daß sie mit großer Wahrscheinlichkeit in eine gut- oder bösartige Geschwulst übergehen wird.

Als wichtigster Schritt in der Hepatocarcinogenese entwickeln sich hyperplastische Areale, die histologisch normalen Hepatozyten gleichen, histochemisch jedoch einige Veränderungen aufweisen (Kitagawa, 1973). Als Bestandteil dieser hyperplastischen Areale werden zwei Typen von Zellen unterschieden, zwischen denen es fließende Übergänge gibt: Zum einen die sogenannten "clear cells", zum anderen die sogenannten "acidophilic cells". Beide Zellarten zeichnen sich durch erhöhte Glykogenspeicherung aus. Ein Merkmal der "acidophilic cells" ist außerdem die Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (Bannasch et al., 1980).

Als weitere positive wie negative Aberrationen in den hyperplastischen Arealen findet man:

- Verminderte Aktivität der Adenosin-Tri-Phosphatase (Schauer und Kunze, 1968),
- verminderte Aktivität der Glucose-6-Phosphatase (Gössner und Friedrich-Frekxa, 1964),
- vermehrte Aktivität der γ -Glutamyl-Transpeptidase (Cameron et al., 1978),
- verminderte Eisenspeicherung (Williams und Yamamoto, 1972),
- Verminderung der Aktivität an Nucleasen (Taper et al., 1971).

Diese Enzymdefektbezirke (EDB) entstehen durch clonales Wachstum aus einer einzigen initiierten Zelle (Rabes et al., 1982).

Für ihre weitere Entwicklung gibt es drei Möglichkeiten:

1. Sie können in den normalen Phänotyp revertieren und mit dem umgebenden Leberparenchym verschmelzen, bleiben aber trotzdem weiter potentiell präneoplastisch, denn die Initiation von Zellen ist ein irreversibler Vorgang (Farber, 1976). Die Zellen befinden sich damit im "latent" oder "dormant state" (Berenblum, 1975).
2. Sie können in dem Stadium der Präneoplasie verbleiben.
3. Subpopulationen innerhalb der Enzymdefektbezirke können sich bei fortdauernder Carcinogengabe zu hepatocellulären Carcinomen entwickeln (Rabes et al., 1972).

Für die Annahme, daß präneoplastische Herde tatsächlich die Vorläufer von Malignomen darstellen, sprechen einige Hinweise:

- Sie gehen dem Erscheinen von Carcinomen voraus (Kitagawa und Sugano, 1973).
- EDB und Carcinome zeigen ähnliche Enzymaberrationen (Emmelot und Scherer, 1980).
- Innerhalb der präneoplastischen Herde entwickeln sich Mikrocarcinome, die sich durch erhöhte Proliferation von der Umgebung abgrenzen lassen (Rabes et al., 1972).
- Hepatozyten von hyperplastischen Knoten zeigen in vitro fortschreitende Infiltration in ihre Umgebung, neben Metastasierung das wichtigste Kriterium für Malignität (Wanson et al., 1981).
- Das Absetzen der Carcinogenbehandlung nach Erscheinen von EDB vermindert nicht die Inzidenz von Carcinomen, wie es jedoch der Fall ist, wenn die Carcinogengabe vorher abgebrochen wird (Kitagawa und Sugano, 1973).

Mit dem Erscheinen von basophilen Zellen in den EDB ist das letzte Stadium der Präneoplasie erreicht (Grundmann und Sieburg, 1962). Das elektronenmikroskopische Äquivalent dieser intensiven Basophilie ist ein besonders hoher Gehalt an freien und membrangebundenen Ribosomen (Bannasch et al., 1980).

Im Vergleich zu früheren präneoplastischen Stadien findet man nun außerdem

- eine Reduktion des Glykogengehaltes (Bannasch und Müller, 1964),
- das Vorkommen von α -Fetoprotein (Koen et al., 1983),
- ein Anstieg der Aktivität von β -Glucoronidase und Serin-Dehydratase (Kitagawa, 1976).

Nach Berenblum (1975) unterscheidet man bei der Carcinogenese den Induktionsprozeß (Initiation) vom Wachstumsprozeß (Promotion). Während die Initiation von Zellen schon nach einmaliger Carcinogengabe erfolgt und zur Ausbildung von präneoplastischen Bezirken im "dormant state" führt, bedarf es langdauernder Carcinogengabe während der Promotionsphase zur Entwicklung von Carcinomen aus Subpopulationen dieser Bezirke. Diese Subpopulationen besitzen eine während der Initiation erworbene Resistenz gegenüber der toxischen Wirkung von Carcinogenen, die zu einem Proliferationsvorteil vor den übrigen Zellen führt: Bei fortdauernder Carcinogengabe kommt es zum "selektiven Wachstum" der Subpopulation, das sich nach zusätzlichen Proliferationsreizen wie einer PH besonders deutlich zeigt (Solt und Farber, 1976; Rabes, 1979).

Erst nach Erreichen eines "critical size" (Rabes und Szymkowiak, 1979) kommt es zum autonomen Wachstum des neoplastischen Clons (Craddock und Frei, 1974). Von diesem Zeitpunkt an bleibt die Proliferationssteigerung der EDB nach PH aus (Rabes et al., 1970).

Nach Abschluß der Initialphase kann die weitere Carcinogengabe auch durch ein Cocarcinogen bzw. ein Nichtcarcinogen mit Promotionscharakter ersetzt werden, wobei es noch nicht ganz klar ist, ob diese Promotoren eine spezielle Promotionswirkung besitzen, oder ob sie nur über eine allgemeine Proliferationssteigerung zur Ausbildung von Carcinomen führen (Rabes, 1979).

Als erste Substanz mit promovierender Wirkung fand man 1941 das Krotonöl bei der Erzeugung von Hauttumoren an Mäusen. Inzwischen sind viele Stoffe mit Promotionswirkung, auch an der Leber, bekannt, unter anderem Phenobarbital (PB). Alleinige Phenobarbitalbehandlung induziert die Vermehrung von Mitochondrien und Microbodies, außerdem die Prolifera-

tion des glatten ER mit Vermehrung mikrosomaler Enzyme. Dadurch kommt es zur Vergrößerung des Zytoplasmas und damit auch zur Volumenvergrößerung der gesamten Leber (nach fünf Tagen um 30 %). Eine ausgeprägte Proliferationssteigerung der Hepatozyten bewirkt PB jedoch nicht (Stäubli et al., 1969; Tuczec et al., 1975). Außerdem zeigt es keinen carcinogenen Effekt (Pereira et al., 1982; Peraino et al., 1971).

Nach Carcinogenexposition dagegen wirkt PB selektiv proliferationssteigernd auf initiierte Zellen und verkürzt auf diese Weise die Latenzphase (Kitagawa und Sugano, 1978; Schulte-Herrmann et al., 1981). Sowohl EDB als auch Tumore treten vermehrt und beschleunigt mit erhöhter Wachstumsrate auf. Dabei spielt der Zeitraum zwischen initiiender Carcinogenapplikation und Beginn der PB-Behandlung keine Rolle. Auf Differenzierungsgrad und Metastasierung der Tumore hat PB keinen Einfluß (Peraino et al., 1971/1973).

Die Hauptaufgabe dieser Arbeit bestand darin, anhand von EDB die Carcinogenempfindlichkeit der Hepatozyten während G₁- und S-Phase an der Hydroxyharnstoff-synchronisierten regenerierenden Leber zu vergleichen. Zusätzlich wurden EDB auf Übereinstimmung hinsichtlich verschiedener Tumormarker untersucht.

Im biologischen Teil der Arbeit wurden Tumorinzidenz und Zeitpunkt der Carcinogen-Tumorentstehung sowie die Überlebenszeit der Tiere nach Carcinogenexposition ermittelt.

Die Behandlung der Tiere erfolgte grundsätzlich nach dem Versuchsmodell von Pitot (Pitot et al., 1978), d. h. einmalige Diäthylnitrosamingabe im Anschluß an eine partielle Hepatektomie und schließlich Phenobarbitaldauerbehandlung,

doch bot die exakte Abgrenzung von G₁- und S-Phase am HU-synchronisierten System gegenüber dem Pitot-Modell analytische Vorteile.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1 VERSUCHSTIERE

Die Versuche wurden an männlichen Ratten (Wistar AF/Hann) eigener Zucht mit einem Gewicht zwischen 200 und 225 g durchgeführt. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen im klimatisierten Tierstall bei normalem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten Wasser und Trockenfutter (Altromin) ad libitum.

2 BILDUNG DER VERSUCHSGRUPPEN

Es wurden zwei Gruppen "S" und "G" gebildet. Je 20 Tiere aus beiden Gruppen wurden für den Hauptversuch verwendet. Je zwei Tiere wurden für Vergleichsfärbungen von Serienschnitten verwendet. Die übrigen 26 Tiere in Gruppe G bzw. 28 Tiere in Gruppe S waren für den biologischen Versuch bestimmt.

3 VERSUCHSBESCHREIBUNG

Bei den Tieren beider Gruppen wurde eine partielle Hepatektomie durchgeführt.

Die Tiere der Gruppe S erhielten 14 Stunden später - also ca. ein bis zwei Stunden vor Eintritt der ersten Hepatozyten in die S-Phase - eine zehnstündige Hydroxyharnstoffinfusion. Unmittelbar nach Absetzen der Infusion - der überwiegende Teil der Hepatozyten befindet sich zu dieser Zeit am G₁-/S-Übergang - wurde Diäthylnitrosamin verabreicht.

Die Tiere der Gruppe G erhielten bereits vier Stunden nach PH eine DÄNA-Injektion. Dieser Zeitpunkt entspricht der frühen G₁-Phase. Um für beide Versuchsgruppen gleiche Bedingungen zu schaffen, wurde auch bei den Tieren der Gruppe G eine zehnstündige HU-Infusion 14 Stunden nach PH durchgeführt.

Ca. 36 Stunden nach PH wurde bei beiden Gruppen das Standardfutter gegen phenobarbitalhaltiges Spezialfutter ausgetauscht.

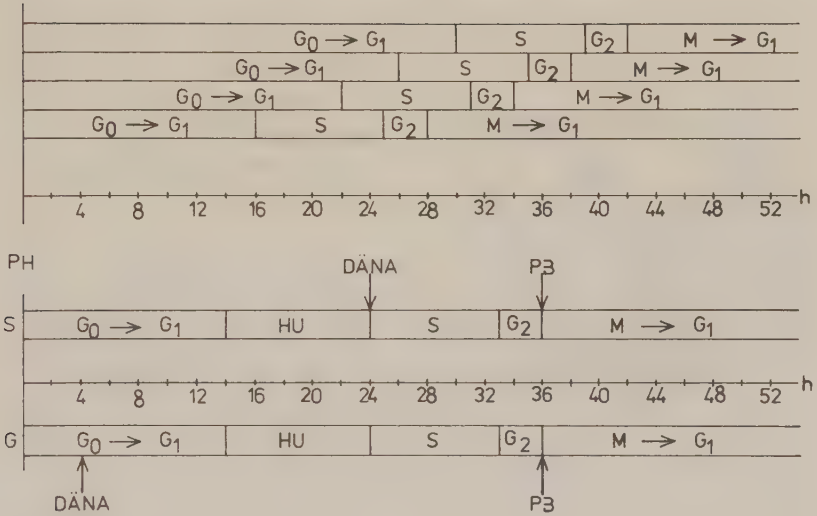


ABBILDUNG 1:

Oben: Normaler Ablauf der Proliferation nach PH (Schematische Darstellung):

gestaffelter Eintritt der Hepatozyten in die S-Phase.

Unten: Schematische Darstellung der beiden Behandlungsgruppen:

Die Tiere der Gruppe S wurden partiell hepatektomiert, 14 Stunden später 10 Stunden lang mit HU infundiert; unmittelbar nach Aufhebung des HU-Blocks wurde DÄNA injiziert; Beginn der PB-Behandlung 36 Stunden nach PH.

Die Tiere der Gruppe G wurden ebenfalls partiell hepatektomiert, vier Stunden später wurde DÄNA injiziert; dann gleichfalls HU-Infusion und PB-Behandlung.

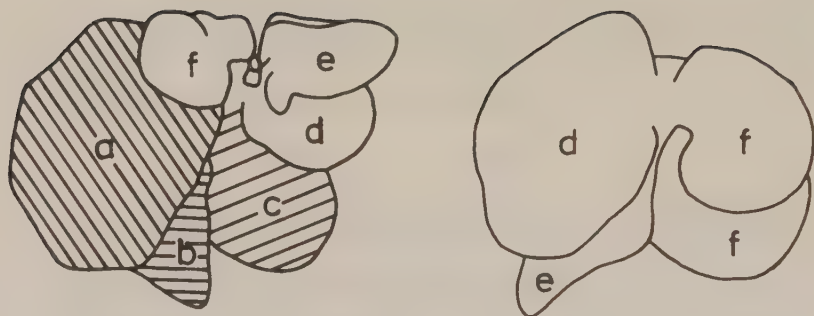


ABBILDUNG 2:

Links: Schematische Darstellung der normalen Rattenleber; Viszeralansicht; der schraffierte Teil wird bei der PH entfernt.

Rechts: Regenerierte Leber nach PH; Parietalansicht;

- a) Lobus sinister lateralis
- b) Lobus sinister medialis
- c) Lobus dexter medialis
- d) Lobus dexter lateralis
- e) Processus caudatus
- f) Processus papillaris

4 MATERIAL UND METHODIK

4.1 Partielle Hepatektomie

Alle Tiere wurden zwischen 17.00 und 22.00 Uhr operiert. Die PH wurde unter Äthernarkose nach der Methode von Higgins und Anderson (1931) durchgeführt, d. h. Entfernung des Lobus dexter medialis, des Lobus sinister medialis und des Lobus sinister lateralis.

4.2 Hydroxyharnstoff-Infusion

Die Hydroxyharnstoff-Infusion wurde 14 Stunden nach PH, also zwischen 7.00 und 11.00 Uhr, angelegt. Zur Durchführung der Infusion wurden die Tiere in Einzelkäfige mit Zugang zu Wasser und Futter gesetzt, wobei der Schwanz außerhalb des Käfigs fixiert wurde. Unter Äthernarkose wurde eine Schwanzvene freipräpariert und kanüliert (Iseler, 1977). Zum schnelleren Erreichen eines ausreichenden Wirkstoffspiegels wurde zunächst eine Bolusinjektion von 1,69 mmol HU/kg Körpergewicht gegeben, darauf wurde die zehnstündige Infusion mit einer Konzentration von 1,25 mmol HU/kg Körpergewicht pro Stunde mittels Perfusor angeschlossen (Hydroxyharnstoff, reinst, Firma Serva, Feinbiochemica, Heidelberg). Diese Dosierung ergibt nach einer Stunde eine HU-Konzentration von 1,7 mM im Serum (Rabes et al., 1977).

Hydroxyharnstoff verhindert im Zellzyklus reversibel den Übergang von der G₁- zur S-Phase. Auf DNS-synthetisierende Zellen wirkt es toxisch. Da die Hepatozyten nach PH unter Normalbedingungen jedoch frühestens nach 15 Stunden in die S-Phase eintreten, erzeugt man bei einem HU-Infusionsbeginn 14 Stunden nach PH keine toxischen Schäden an den Hepatozyten.

Nach zehnstündiger Infusion ist der überwiegende Teil der Hepatozyten synchronisiert und tritt unmittelbar nach Absetzen des Blocks in die S-Phase ein, da der Wirkstoffspiegel in der Leber, trotz einer Halbwertszeit von ca. 80 Minuten im Serum, sehr schnell abfällt (Rabes et al., 1977).

4.3 Diäthylnitrosamin-Injektion

Als Carcinogen wurde N-Nitroso-Diäthylamin, rein 99 % von der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg, verwendet. Es wurde in physiologischer Kochsalzlösung (1,15 ml DÄNA/100 ml NaCl) in einer Dosis von 40 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Bei der Gruppe S erfolgte die Injektion unmittelbar nach Absetzen der HU-Injektion, bei der Gruppe G bereits vier Stunden nach PH.

DÄNA besitzt gegenüber anderen Carcinogenen einige Vorzüge für die Lebercarcinogenese: Bei der hier angewandten Dosis von 40 mg/kg Körpergewicht treten nur geringe toxische Nebenwirkungen auf bei sicherer carcinogener Wirkung. Es besitzt nur eine kurze Halbwertszeit, wird also schnell wieder aus dem Körper eliminiert. Außerdem besteht eine Organotropie für die Leber, wobei fast ausschließlich hepatozelluläre Carcinome entstehen.

4.4 Phenobarbitaldauerfütterung

Etwa 36 Stunden nach PH wurde das Standardfutter gegen ein Spezialfutter mit 0,05 % Phenobarbitalzusatz (Fluka, Neu-Ulm) ausgetauscht, welches die Tiere bis zu ihrem natürlichen Tod oder bis wenige Tage vor dem Tötungszeitpunkt erhielten (vgl. S. 20 - 25).

4.5 Kontrollen

Auf spezifische Kontrolltiere, die nur partiell hepatektomiert und mit HU-Dauerinfusion behandelt wurden, wurde verzichtet, da in bereits publizierten Experimenten nachgewiesen werden konnte, daß HU-Behandlung in Verbindung mit PH ohne nachfolgende Carcinogengabe keine präneoplastischen Populationen im Leberparenchym erzeugt (Rabes et al., 1986).

5 AUSWERTUNG DES HAUPTVERSUCHES

5.1 Tötungszeitpunkt und Aufbereitung der Leber

Zwei, vier, sechs und neun Monate $\pm$ zwei Tage nach PH wurden je fünf Tiere aus beiden Gruppen durch Nackenschlag getötet.

Die Leber wurde sofort entnommen. Von jedem Lappen wurden Stücke von etwa 1 cm² Querschnittsfläche geschnitten, und zwar vom Lobus dexter lateralis drei, vom Processus caudatus zwei und vom Processus papillaris aus jedem der beiden Lappchen ein Stück. Die Stücke wurden auf Träger gebracht und mit Kohlensäureschnee eingefroren.

Der Vorgang vom Töten bis zum Abschluß des Einfrierens dauerte ca. 15 Minuten. Aus jedem der sieben Leberstücke wurden vier Kryostatschnitte mit einer Schnittdicke von 10 μ m im Abstand von mindestens 200 μ m angefertigt.

5.2 Herstellung der enzymhistochemischen Präparate

Zur Untersuchung der Schnitte auf EDB wurde die Adenosintriphosphatase (ATPase)-Aktivität nach der modifizierten Methodik von Wachstein und Meisel (1957) dargestellt. Dabei wird das Substrat (Adenosin-5'-triphosphat, Firma Boehringer, Mannheim) in Aqua bidest. gelöst (10 mg Substrat/5 ml Aqua bidest.), mit einer Lösung aus 0,2 M Tris-Maleat-Puffer (pH 7,5), 0,1 M Magnesium-Sulfat, Aqua bidest. und 2 % Bleinitrat vermischt, filtriert und im Brutschrank bei 37 °C vorgewärmt. In dieser Lösung werden die Präparate 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Wässerung werden die Schnitte in 2 % H₂S entwickelt, in 10 % Formol fixiert und anschließend in Glyceringelatine eingedeckt.

Bei einer Probefärbung an Leberschnitten eines Tieres der Gruppe S zeigte sich, daß die Schnitte nicht auszuwerten waren.

EDB sind normalerweise an ihrer helleren Färbung gegenüber der Umgebung aufgrund der reduzierten Enzymreaktion in diesen Herden zu erkennen. Grundsätzlich fällt die ATPase-Reaktion in der Leber nicht gleichmäßig aus, sondern nimmt vom Portalfeld zur Zentralvene hin ab. Bei den Präparaten dieses Tieres aber war diese Abstufung in der Färbungsintensität so ausgeprägt, daß man Enzymdefektbezirke nicht mit Sicherheit vom normalen Lebergewebe abgrenzen konnte. Eine Vergleichsfärbung zwischen einem weiteren Tier dieser Gruppe und einem ebenfalls behandelten Tier, das jedoch immer Normalfutter erhalten hatte, ließ vermuten, daß die Phenobarbitalfütterung der Grund für die unregelmäßige Färbung sein mußte.

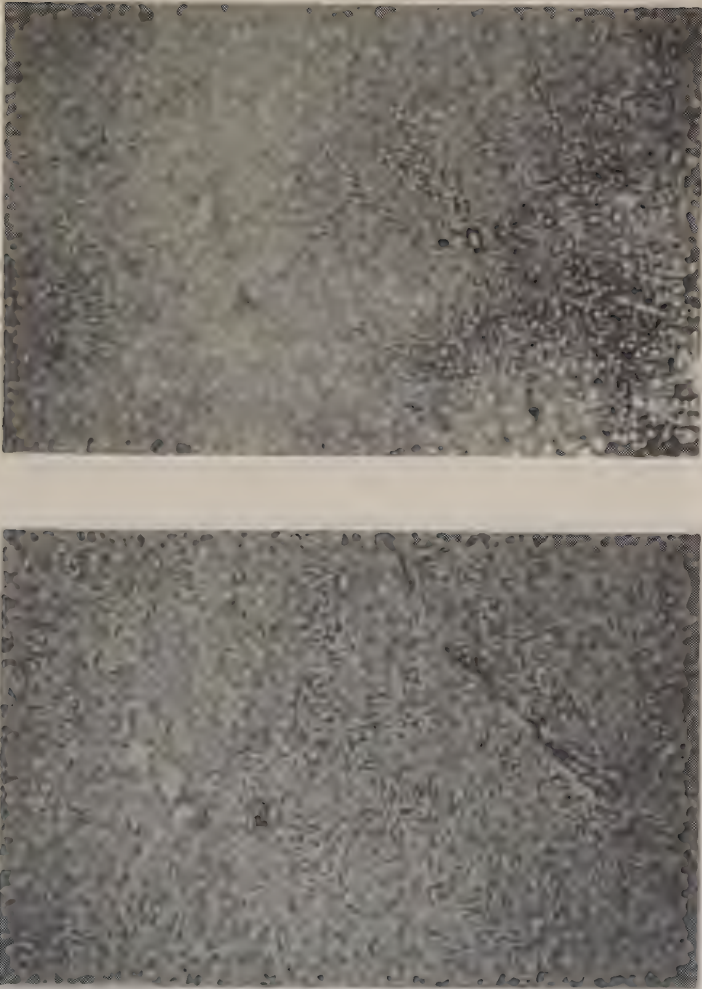


ABBILDUNG 3:

Vergleich der ATPase-Reaktion bei einem Tier mit Phenobarbitalfütterung (oben) und einem entsprechend behandelten Tier mit Normalfütterung (unten) (Vergrößerung: 100fach).

Daraufhin wurde bei 15 Tieren, die, abgesehen von der HU-Infusion, genauso behandelt worden waren wie die Tiere der Gruppe G, das Spezialfutter wieder gegen Normalfutter ausgetauscht.

Täglich wurde ein Tier getötet und die Leber im Vergleich zu der eines völlig unbehandelten Tieres gefärbt.

Das Färbungsergebnis wurde von Tag zu Tag gleichmäßiger, d. h., die Abstufung in der Färbungsintensität zwischen Portalfeldern und Zentralvenen wurde schwächer, so daß die EDB mit ihrem reduzierten Gehalt an ATPase und damit ihrer reduzierten Anfärbbarkeit schärfer gegen das Normalgewebe abgrenzbar waren. Vom zehnten Tag an nach Phenobarbitalentzug ergab sich keine weitere Verbesserung mehr der Färbung.



ABBILDUNG 4 a:



ABBILDUNG 4 b



ABBILDUNG 4 c

ABBILDUNG 4 a - c:

Vergleich der Färbungsergebnisse bei verschiedenen Zeitintervallen zwischen Phenobarbitalentzug und Tötung der Tiere (Vergrößerung: 100fach).

- a) Zeitintervall von 4 Tagen
- b) Zeitintervall von 7 Tagen
- c) Zeitintervall von 10 Tagen

Um die EDB gegenüber der Umgebung eventuell noch besser abgrenzen zu können, wurde bei einem Tier die Inkubationszeit der Schnitte im Substrat variiert. Mit einem Steigerungsintervall von jeweils zehn Minuten wurden die einzelnen Präparate zwischen zehn Minuten und 180 Minuten inkubiert.

Dabei zeigten die Präparate mit 90minütiger Inkubation das beste Ergebnis.

Für die Auswertung der 44 Versuchstiere wurde deshalb eine Inkubationszeit von 90 Minuten bei vorherigem zehntägigem Phenobarbitalentzug gewählt.

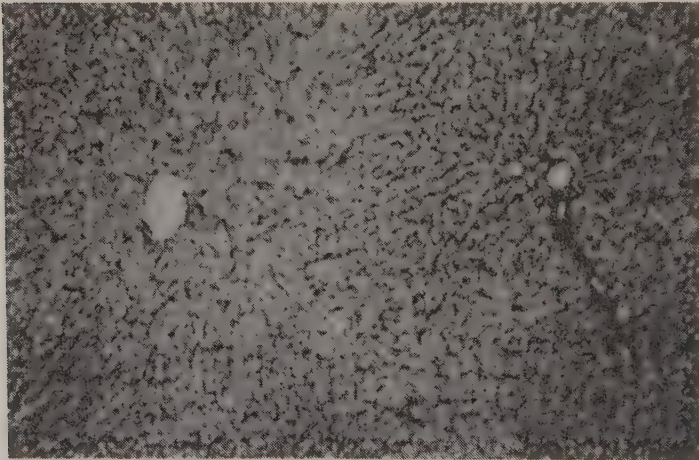


ABBILDUNG 5 a

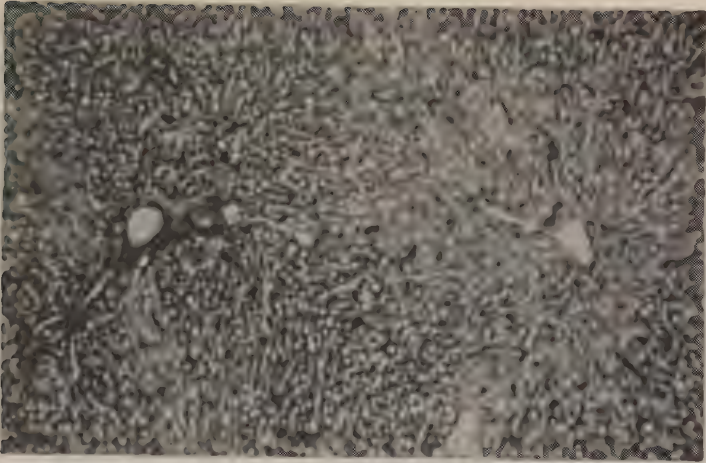


ABBILDUNG 5 b



ABBILDUNG 5 c

ABBILDUNG 5 a - c:

Vergleich der ATPase-Reaktion bei verschiedener Inkubationszeit der Präparate im Medium (Vergrößerung: 100fach).

- a) Inkubationszeit von 30 Minuten
- b) Inkubationszeit von 60 Minuten
- c) Inkubationszeit von 90 Minuten

5.3 Auswertung der enzymhistochemischen Präparate

Die Auswertung der Präparate wurde mit einem Mikroskop durchgeführt, angeschlossen an ein Videoplansystem (Kontron, München).

Das Prinzip der Auswertung bestand darin, EDB in diesen Präparaten zu ermitteln und unter bestimmten Parametern auszumessen. Die Meßdaten wurden nach Auswertungseinheiten zusammengefaßt, mit Hilfe statistischer Berechnungen weiterverarbeitet und zwischen den beiden Versuchsgruppen verglichen.

Das Videoplansystem ist zur Erfassung und Berechnung von geometrischen Strukturen geeignet. Es besteht aus einem Magnetmeßtablett mit Auswertestift, einer Recheneinheit zum Einlesen von Programmen und zur Archivierung von Daten, einem Monitor sowie einem Drucker. Mit dem Grundrechenprogramm der Recheneinheit können mehrere geometrische Parameter gleichzeitig ausgemessen und erfaßt werden. Die gewonnenen Daten erscheinen auf dem Monitor und können vom Drucker ausgedruckt oder für weitere Auswertungen auf einer zweiten Diskette gespeichert werden. Zusätzlich zum Grundprogramm gibt es verschiedene Programme für spezielle Auswertungen der gespeicherten Meßdaten, wie z. B. "statistic program" oder "classification program".

Zunächst wurden von jedem Tier einige Präparate ausgewählt, deren Flächen ausgemessen und summiert, um eine Gesamtfläche von 10 cm² zu erhalten, die als Referenzfläche diente. Die Auswahl der Schnitte erfolgte jeweils so, daß der größtmögliche Anteil der drei Leberlappen an der Gesamtfläche von 10 cm² in etwa auch ihrer Gewichtung in der regenerierten Leber entsprach. Bei einer durchschnittlichen Größe der Präparate von 1 cm² wurden dafür etwa zehn Schnitte benötigt. Zum Ausmessen wurden die Präparate in ein Projek-

tionsgerät geschoben und der Umriß der projizierten Fläche auf Papier gezeichnet. Unter Berücksichtigung des Vergrößerungsfaktors wurden dann die Zeichnungen mit dem Auswertestift auf dem Magnettablett umfahren, und sowohl die Gesamtfläche von $10 \text{ cm}^2 \pm 0,005 \text{ cm}^2$ als auch die Flächen der einzelnen Präparate für jedes Tier unter einer bestimmten Kodierung gespeichert und ausgedruckt. Bei sieben verschiedenen Leberstücken und zehn zur Ausmessung der Gesamtfläche benötigten Präparaten mußten dreimal jeweils zwei Schnitte aus demselben Leberstück ausgewählt werden. Im weiteren Verlauf der Auswertung zeigte sich jedoch, daß einige EDB so groß waren, daß sie dadurch unter Umständen auf Stufenschnitten zweimal erfaßt werden würden. Deshalb wurde eine Gesamtfläche von nur 7 cm^2 als Referenzfläche gewählt, so daß aus einem Leberstück in der Regel jeweils nur ein Schnitt ausgewertet wurde. Dazu mußten alle bisherigen Messungen gelöscht werden. Die Auswahl der Präparate und Ausmessung der Gesamtfläche von $7 \text{ cm}^2 \pm 0,005 \text{ cm}^2$ erfolgte genauso wie bei der ersten Auswertung.

Danach wurden die einzelnen Schnitte im Mikroskop meanderförmig auf EDB untersucht. Dabei wurden nur solche Bezirke berücksichtigt, die klar gegen die Umgebung abgegrenzt waren und eine Mindestfläche von $0,005 \text{ mm}^2$ aufwiesen. Diese Bezirke wurden ebenfalls mit dem Auswertestift auf dem Magnettablett umfahren und unter Berücksichtigung des Vergrößerungsfaktors im Mikroskop unter folgenden Parametern gespeichert:

1. Anzahl der Enzymdefektbezirke;
2. Fläche der einzelnen EDB sowie Gesamtfläche aller EDB pro Präparat;
3. maximaler Durchmesser (D_{max}) der einzelnen EDB.

6 VERGLEICHSFÄRBUNG VON SERIENSCHNITTEN

Elf Monate nach PH wurden Serienschritte von je zwei Tieren beider Gruppen hergestellt, um verschiedene enzymhistochemische Reaktionen und die entsprechende Autoradiographie quantitativ morphologisch zu vergleichen.

6.1 ^3H -TdR-Pulsmarkierung

Für die Autoradiographie wurde Tritium-markiertes Thymidin (spezifische Aktivität 5 C/mM, Radiochemical Centre, Amer-sham) verwendet. Die Originallösung wurde zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung auf 200 $\mu\text{Ci/ml}$ verdünnt und dann in einer Dosis von 0,8 $\mu\text{Ci/g}$ intraperitoneal injiziert.

6.2 Herstellung der Präparate

Eine Stunde nach Thymidininjektion wurden alle Tiere durch Nackenschlag getötet. Die Aufbereitung der Leber erfolgte genauso wie bei den Tieren des Hauptversuchs, die Schnitte wurden ebenfalls im Kryostat mit einer Schnittdicke von 10 μ in Serie hergestellt. Dabei wurde jeder erste Schnitt zum ATPase-Nachweis verwendet, jeder zweite zum Glukose-6-Phosphatase-Nachweis, jeder dritte für die Glykogenfärbung nach Best, jeder vierte zum Nachweis von Gamma-Glutamyl-Transpeptidase (GGT) und jeder fünfte für die Autoradiographie, wobei jedoch die Glykogenfärbung und der GGT-Nachweis von der Färbung her keine verwertbaren Ergebnisse brachten. Der Abstand zwischen den einzelnen Schnittserien betrug etwa 400 μm .

Der ATPase-Nachweis wurde wieder nach der Methode von Wachstein und Meisel durchgeführt, ebenso der Glucose-6-Phos-

phatase-Nachweis, wobei der einzige Unterschied zur ATPase-Färbung im Substrat (Glucose-6-Phosphat, Firma Boehringer, Mannheim, 10 mg Substrat/5 ml Aqua bidest.) und im pH-Wert (6,5) des Puffers liegt.

6.3 Autoradiographie

Für die Autoradiographie wurde der jeweils 5. Schnitt einer Schnittserie 24 Stunden in neutralisiertem 5prozentigem Formol fixiert unter Zusatz von 0,5 mg/ml inaktivem Thymidin zum Austausch mit dem nicht in die DNS eingebauten radioaktiven Thymidin. Dann wurden die Präparate mit einer Chromalaungelatinelösung (0,5 g Gelatine, 0,05 g Chromalaun in 100 ml Aqua dest.) überzogen und, nach Aufbringung des Stripping Films Kodak AR 10, 27 Tage exponiert. Danach wurden die Schnitte bei 21 °C mit Amidol entwickelt, gewässert, mit Natriumthiosulfat fixiert, getrocknet und schließlich mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

6.4 Auswertung der Serienschnitte

Zur Untersuchung der ATPase-Defektbezirke auf Übereinstimmung mit anderen Enzymaberrationsherden wurden die Serienschnitte unter einem Maskenvergleichsmikroskop (Leitz, Wetzlar) untersucht. Dieses Mikroskop besteht aus zwei getrennten Strahlengängen, die sich in einem Binokular vereinigen, so daß jeweils zwei Präparate im Gesichtsfeld zur Deckung gebracht und direkt verglichen werden können.

Von jedem der drei Leberlappen eines Tieres wurde die von der Färbung her beste Schnittserie ausgesucht. Zunächst wurde das ATPase-Präparat auf dem linken Objektisch befestigt und die ersten 20 EDB dieses Schnittes mit dem Auswertestift auf dem Magnettablett umfahren. Die so ermittelten Flächeninhalte wurden ausgedruckt, um auch eine grö-

Benmäßige Kontrolle bezüglich der Kongruenz der Präparate einer Schnittserie und ihrer Enzymaberrationsherde zu erhalten. Dann wurde das konsekutive Glucose-6-Phosphatase-Präparat auf dem rechten Objektisch befestigt, mit dem ATPase-Präparat zur Deckung gebracht und auf Übereinstimmung der 20 präneoplastischen Herde in beiden Präparaten sowohl morphologisch-qualitativ als auch quantitativ untersucht. Schließlich wurde der Autoradiographie-Schnitt derselben Schnittserie mit dem ATPase-Schnitt zur Feststellung der Proliferationsaktivität in den ATPase-Defektbezirken verglichen. Dazu wurde der Markierungsindex in den Bezirken bestimmt, die von der Lokalisation den 20 Enzymaberrationsherden im ATPase-Präparat entsprachen. Zur Sicherung der Kongruenz wurden dabei die Grenzen des jeweiligen EDB durch wiederholtes Aufblenden der linken Durchlichtbeleuchtung ständig kontrolliert. Die Bestimmung des MI erfolgte durch Auszählen ^3H -TdR-markierter Hepatozyten als Fraktion der Gesamtzellzahl der Hepatozyten in einem EDB.

7 BIOLOGISCHER VERSUCH

Die Tiere des biologischen Versuchs erhielten das phenobarbitalhaltige Spezialfutter bis zu ihrem natürlichen Tod.

Alle Tiere wurden seziert und Tumorinzidenz und Tumorlokalisation sowie das Auftreten von Metastasen wurden beschrieben.

C. ERGEBNISSE

1 HAUPTVERSUCH

1.1 Ergebnisse des Hauptversuchs

Die Präparate wurden nach den Parametern Anzahl, Fläche sowie maximaler Durchmesser der EDB ausgewertet. Mit Hilfe des Statistikprogramms des Videoplangerätes wurden die gewonnenen Daten weiterverarbeitet.

Auf den nächsten Seiten werden diese Meßergebnisse sowohl für jedes einzelne Tier als auch zusammengefaßt nach Auswertungseinheiten (zwei, vier, sechs und neun Monate nach PH) im Vergleich Gruppe G, also die Tiere, die in der G₁-Phase mit DÄNA behandelt wurden, zu Gruppe S, das sind die Tiere, die in der S-Phase mit DÄNA behandelt wurden, in Tabellen und Kurven dargestellt, und zwar zunächst einzeln für folgende Kriterien:

1. Anzahl der EDB
2. Gesamtfläche der EDB
3. Prozentualer Flächenanteil der Gesamtfläche der EDB an der Gesamtpräparatefläche
4. Durchschnittliche Größe der EDB und größter Einzelwert (max)
5. Durchschnittlicher maximaler Durchmesser (D_{max}) der EDB und größter Einzelwert (max).

Bei den zusammengefaßten Ergebnissen der einzelnen Auswertungseinheiten wurde jeweils der arithmetische Mittelwert von allen fünf Tieren $\pm$ Standardfehler angegeben.

Intervall nach DANA	Tier	Anzahl der ATPase- Defektbezirke		Mittelwert $\pm$ SE	
		Gruppe G	Gruppe S	Gruppe G	Gruppe S
2 Monate	1	6	3		
	2	2	10	5,4	6,4
	3	2	10	$\pm$ 1,5	$\pm$ 1,6
	4	9	3		
	5	8	6		
4 Monate	1	3	6		
	2	1	8	6,2	11
	3	11	13	$\pm$ 2,4	$\pm$ 3,3
	4	3	23		
	5	13	5		
6 Monate	1	19	22		
	2	18	16	22	26,8
	3	14	24	$\pm$ 5,8	$\pm$ 4,3
	4	14	41		
	5	45	31		
9 Monate	1	122	94		
	2	72	108	54,4	93,6
	3	40	122	$\pm$ 19,7	$\pm$ 9,3
	4	9	95		
	5	29	59		

TABELLE 1: Anzahl der ATPase-Defektbezirke in der Leber auf einer Schnittfläche von 7 cm² zwei, vier, sechs und neun Monate nach partieller Hepatektomie im Vergleich Gruppe S zu Gruppe G.

In Tabelle 1 und Abbildung 6 sind die Ergebnisse für den Parameter Anzahl der ATPase-Defektbezirke dargestellt, der als Maß für die Initiation zu sehen ist. Sowohl in Gruppe G als auch in Gruppe S steigt die Anzahl der EDB vom zweiten zum neunten Monat nach PH stark an, wobei sich der Wert in Gruppe G verzehnfacht, während er in Gruppe S nach neun Monaten ca. 15mal höher liegt als nach zwei Monaten. Dabei erfolgt der Anstieg in beiden Gruppen zunächst allmählich und erst vom vierten bzw. vom sechsten Monat an sprunghaft. Beim Vergleich zwischen beiden Gruppen liegen die Werte für Gruppe S in allen Auswertungseinheiten höher als in

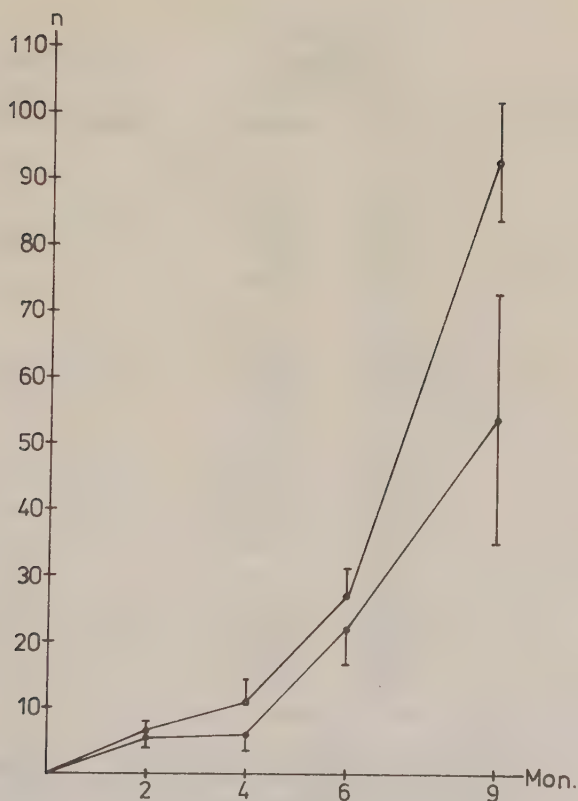


ABBILDUNG 6:

Durchschnittliche Anzahl der ATPase-Defektbezirke mit Standardfehler (Vertikalen) pro Auswertungseinheit.

Abszisse: Zeitpunkt der Auswertung nach PH (Monate)
Ordinate: Anzahl der Enzymdefektbezirke/7 cm² Auswertungsfläche

Gruppe G. Dieser Unterschied ist jedoch nur nach vier und neun Monaten deutlich ausgeprägt.

Intervall nach DÄNA	Tier	Gesamtfläche der ATPase- Defektbezirke		Mittelwert $\pm$ SE	
		Gruppe G	Gruppe S	Gruppe G	Gruppe S
2 Monate	1	0,058	0,068		
	2	0,081	0,269		
	3	0,029	0,373	0,11	0,23
	4	0,245	0,111	$\pm$ 0,04	$\pm$ 0,06
	5	0,143	0,342		
4 Monate	1	0,121	0,968		
	2	0,069	0,369		
	3	0,285	0,619	0,17	0,97
	4	0,128	2,441	$\pm$ 0,04	$\pm$ 0,38
	5	0,259	0,433		
6 Monate	1	0,733	1,068		
	2	1,700	0,938		
	3	0,567	6,231	1,13	3,55
	4	0,459	6,532	$\pm$ 0,34	$\pm$ 1,21
	5	2,179	2,983		
9 Monate	1	11,793	17,252		
	2	8,981	14,292		
	3	2,017	38,628	5,21	18,69
	4	1,177	16,889	$\pm$ 2,17	$\pm$ 5,35
	5	2,084	6,427		

TABELLE 2: Gesamtfläche der EDB (mm²) in der Leber auf einer Schnittfläche von 7 cm² zwei, vier, sechs und neun Monate nach PH im Vergleich Gruppe S zu Gruppe G.

Tabelle 2 und Abbildung 7 zeigen die Ergebnisse für den Parameter Gesamtfläche der EDB. Auch hier sieht man in beiden Gruppen einen zunächst allmählichen, vom sechsten Monat an steileren (Gruppe G) bis sprunghaften (Gruppe S) Anstieg. Die Gesamtfläche der Enzymaberrationsherde liegt dabei in Gruppe G nach neun Monaten ca. 50mal höher als nach zwei Monaten, während sie in Gruppe S ca. 90mal so viel beträgt. Im Vergleich der beiden Gruppen fällt der Unterschied nach zwei Monaten noch gering aus, vom vierten Monat an zeigen sich deutlich höhere Werte für Gruppe S als für Gruppe G.

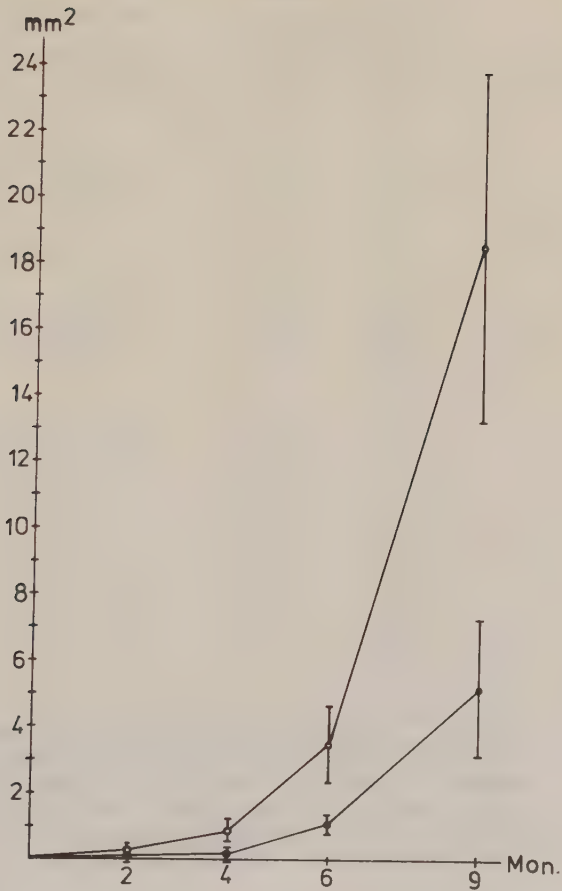


ABBILDUNG 7:

Durchschnittliche Gesamtfläche der ATPase-Defektbezirke mit Standardfehler (Vertikalen) pro Auswertungseinheit.

Abszisse: Zeitpunkt der Auswertung nach PH (Monate)
Ordinate: Gesamtfläche der EDB (mm^2)/7 cm^2 Auswertungsfläche

Intervall nach DÄNA	Tier	Gesamtfläche der ATPase- Defektbezirke (÷)		Mittelwert ± SE	
		Gruppe G	Gruppe S	Gruppe G	Gruppe S
2 Monate	1	0,008	0,010		
	2	0,012	0,039		
	3	0,004	0,053	0,02	0,03
	4	0,035	0,016	± 0,006	± 0,01
	5	0,020	0,049		
4 Monate	1	0,017	0,138		
	2	0,010	0,053		
	3	0,041	0,089	0,02	0,14
	4	0,018	0,349	± 0,006	± 0,05
	5	0,037	0,062		
6 Monate	1	0,105	0,153		
	2	0,243	0,134		
	3	0,081	0,890	0,16	0,51
	4	0,066	0,933	± 0,05	± 0,17
	5	0,311	0,426		
9 Monate	1	1,685	2,465		
	2	1,283	2,042		
	3	0,288	5,518	0,74	2,67
	4	0,168	2,413	± 0,31	± 0,76
	5	0,298	0,918		

TABELLE 3: Prozentanteil der ATPase-defizienten Flächen in bezug auf die Gesamtfläche von 7 cm² zwei, vier, sechs und neun Monate nach PH im Vergleich Gruppe S zu Gruppe G. Dargestellt sind die Prozentwerte für jedes Tier sowie durchschnittlicher Prozentanteil ± Standardfehler für jede Auswertungseinheit.

In Tabelle 3 und Abbildung 8 zeigen die Werte im Prinzip denselben Anstieg wie in Tabelle 2 bzw. Abbildung 7, doch ist die Gesamtfläche der EDB hier als prozentualer Anteil an der Gesamtleberschnittfläche angegeben.

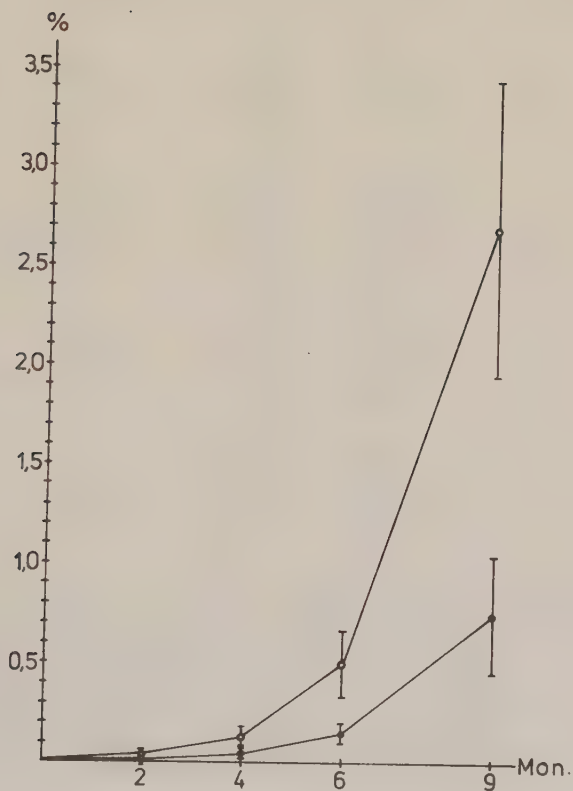


ABBILDUNG 8:

Durchschnittlicher Prozentanteil der ATPase-defizienten Fläche mit Standardfehler (Vertikalen) pro Auswertungseinheit.

Abszisse: Zeitpunkt der Auswertung nach PH (Monate)
Ordinate: ATPase-defiziente Fläche (% der Gesamtleberfläche)

Intervall nach DÄNA	Tier	Durchschnittliche Fläche der EDB		Mittelwert $\pm$ SE Maximum	
		Gruppe G	Gruppe S	Gruppe G	Gruppe S
2 Monate	1	0,010	0,23		
	2	0,041	0,027	0,02	0,04
	3	0,015	0,037	$\pm$ 0,004	$\pm$ 0,004
	4	0,027	0,037		
	5	0,018	0,057	0,121 max	0,095
4 Monate	1	0,040	0,161		
	2	0,069	0,046	0,03	0,09
	3	0,026	0,048	$\pm$ 0,003	$\pm$ 0,017
	4	0,043	0,106		
	5	0,020	0,087	0,082 max	0,831
6 Monate	1	0,039	0,049		
	2	0,094	0,059	0,05	0,13
	3	0,041	0,260	$\pm$ 0,006	$\pm$ 0,030
	4	0,033	0,159		
	5	0,048	0,096	0,574 max	3,746
9 Monate	1	0,097	0,183		
	2	0,125	0,132	0,10	0,20
	3	0,050	0,345	$\pm$ 0,005	$\pm$ 0,028
	4	0,131	0,178		
	5	0,072	0,109	0,520 max	8,701

TABELLE 4: Mittlere Fläche der einzelnen ATPase-Defektbezirke (mm^2) zwei, vier, sechs und neun Monate nach PH im Vergleich Gruppe S zu Gruppe G. Dargestellt sind die durchschnittlichen Flächen für jedes Tier sowie der Mittelwert $\pm$ Standardfehler für jede Auswertungseinheit, außerdem die Fläche des jeweils größten EDB (max) pro Auswertungseinheit.

In Tabelle 4 und Abbildung 9 ist die durchschnittliche Fläche der einzelnen EDB dargestellt, die vom Ausmaß der Promotion abhängig ist. Wiederum liegen die Werte zwei Monate nach PH in Gruppe S nur wenig höher als in Gruppe G, differieren vom vierten Monat an jedoch immer stärker. Die Steigerung in der Gesamtfläche der EDB wird also nicht nur durch das Auftreten von neuen Herden bestimmt, sondern auch vom weiteren Wachstum bereits vorhandener Herde.

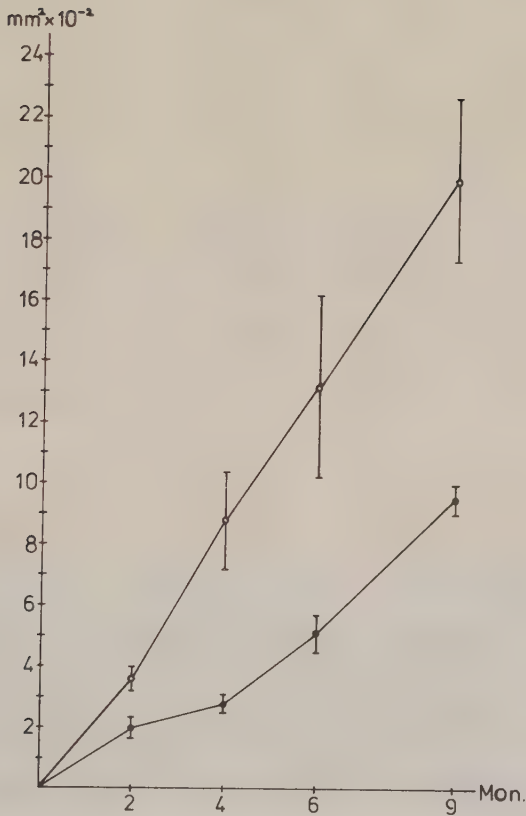


ABBILDUNG 9:

Mittlere Fläche der einzelnen ATPase-Defektbezirke mit Standardfehler (Vertikalen) pro Auswertungseinheit.

Abszisse: Zeitpunkt der Auswertung nach PH (Monate)
Ordinate: Mittlere Fläche der einzelnen EDB (mm²)

Intervall nach DÄNA	Tier	Durchschnittlicher Dmax der EDB		Mittelwert $\pm$ SE Maximum	
		Gruppe G	Gruppe S	Gruppe G	Gruppe S
2 Monate	1	0,146	0,191		
	2	0,340	0,239	0,20	0,27
	3	0,166	0,281	$\pm$ 0,016	$\pm$ 0,017
	4	0,237	0,271		
	5	0,184	0,346	0,432 max	0,575
4 Monate	1	0,274	0,416		
	2	0,417	0,326	0,24	0,39
	3	0,229	0,322	$\pm$ 0,014	$\pm$ 0,023
	4	0,302	0,446		
	5	0,211	0,381	0,472 max	1,151
6 Monate	1	0,285	0,322		
	2	0,387	0,327	0,31	0,43
	3	0,290	0,516	$\pm$ 0,012	$\pm$ 0,025
	4	0,248	0,496		
	5	0,304	0,388	2,690 max	0,968
9 Monate	1	0,425	0,530		
	2	0,478	0,473	0,42	0,53
	3	0,317	0,650	$\pm$ 0,011	$\pm$ 0,019
	4	0,477	0,497		
	5	0,364	0,430	1,171 max	4,321

TABELLE 5: Mittlerer maximaler Durchmesser (Dmax) der einzelnen ATPase-Defektbezirke (mm) zwei, vier, sechs und neun Monate nach PH im Vergleich Gruppe S zu Gruppe G. Dargestellt sind die durchschnittlichen Dmax für jedes Tier sowie der Mittelwert $\pm$ Standardfehler für jede Auswertungseinheit, außerdem der jeweils größte Dmax (max) pro Auswertungseinheit.

Tabelle 5 und Abbildung 10 zeigen die Ergebnisse der Berechnungen des durchschnittlichen maximalen Durchmessers der EDB. Auch hier ergeben sich in allen Auswertungseinheiten höhere Werte für Gruppe S als für Gruppe G. Dieser Unterschied ist aber eher gering. Beide Kurven nehmen einen nahezu parallelen Verlauf. So liegen die Werte in beiden Gruppen nach neun Monaten ca. doppelt so hoch wie zwei Monate nach PH.

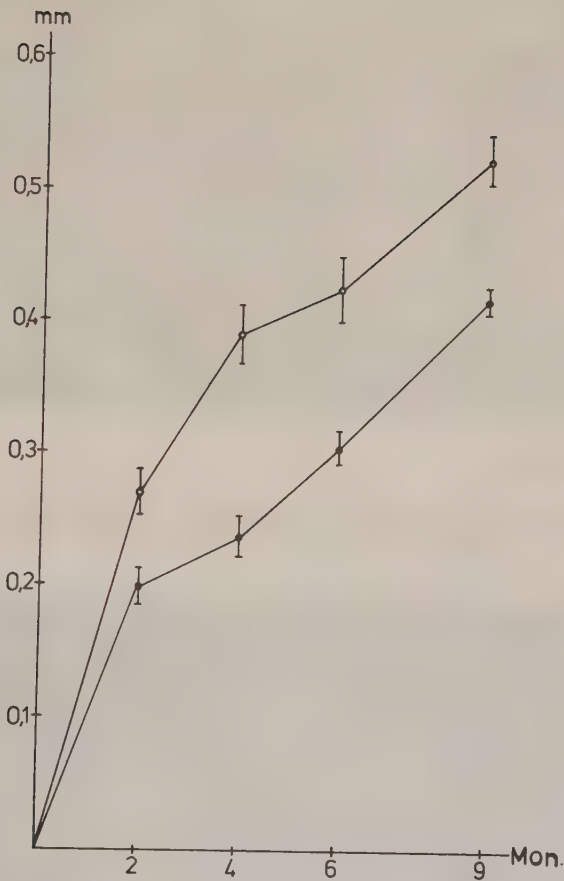


ABBILDUNG 10:

Mittlerer maximaler Durchmesser (Dmax) der einzelnen ATPase-Defektbezirke mit Standardfehler (Vertikalen) pro Auswertungseinheit.

Abszisse: Zeitpunkt der Auswertung nach PH (Monate)
Ordinate: Mittlerer Dmax der einzelnen EDB (mm)



ABBILDUNG 11:

Multiple ATPase-Defektbezirke bei einem Tier der Gruppe S neun Monate nach PH (Vergrößerung: 25fach).



ABBILDUNG 12:

Vier zu einem Herd verschmelzende ATPase-Defektbezirke bei einem Tier der Gruppe S sechs Monate nach PH (Vergrößerung: 40fach).

1.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms des Videoplangerätes.

Es wurden folgende Berechnungen durchgeführt:

$$\text{Mittelwert} \quad \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} ;$$

$$\text{Standardabweichung} \quad SD = \sqrt{\frac{(x_n - \bar{x})^2}{(n - 1)}} ;$$

$$\text{Standardfehler} \quad SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Zur Beurteilung der Ergebnisse hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen G und S wurde ein U-Test mit einem Vertrauensniveau von 95 % durchgeführt. Dabei wurden in allen fünf Parametern jeweils die Mittelwerte aus den fünf Tieren einer Auswertungseinheit zwischen Gruppe G und Gruppe S verglichen. Das Ergebnis der Signifikanzberechnungen ist auf den beiden nächsten Seiten in einer tabellarischen Übersicht in Verbindung mit den jeweils verglichenen Werten dargestellt.

Intervall nach DÄNA	Durchschnittliche Anzahl der EDB/Tier				Durchschnittliche Gesamt- fläche der EDB (mm ²)/Tier			
	Exposition in G ₁ -Phase		S-Phase		Exposition in G ₁ -Phase		S-Phase	
2 Monate	5,4 ± 1,5	n	6,4 ± 1,6		0,11 ± 0,06	n	0,23 ± 0,06	
4 Monate	6,2 ± 2,4	n	11 ± 3,3		0,17 ± 0,04	s	0,97 ± 0,38	
6 Monate	22 ± 5,8	n	26,8 ± 4,3		1,13 ± 0,34	n	3,55 ± 1,21	
9 Monate	54,4 ± 19,7	n	93,6 ± 9,3		5,21 ± 2,17	s	18,69 ± 5,35	

TABELLE 6: Übersicht über die Ergebnisse des Hauptversuches, zusammengefaßt nach Auswertungseinheiten, in Verbindung mit dem jeweiligen Ergebnis des Signifikanztests.

Bei allgemeiner Betrachtung der Ergebnisse kann man sagen, daß sowohl die Werte in beiden Gruppen stetig ansteigen, als auch, daß die Werte der Gruppe S in allen Parametern höher liegen als die der Gruppe G. Nach statistischer Auswertung der Ergebnisse mittels eines U-Tests (Vertrauensniveau 95 %) muß man jedoch feststellen, daß diese Unterschiede zwischen Gruppe G und Gruppe S nur in acht von 20 Fällen signifikant sind. Wie schon bei der Einzeldarstellung der Ergebnisse deutlich geworden, unterscheiden sich die beiden Gruppen zwei Monate nach PH in keinem Parameter stark voneinander. Bei der Anzahl der EDB gibt es überhaupt

Durchschnittliche Gesamtfläche der EDB (÷)/Tier		Durchschnittliche Fläche der EDB (mm ²)/5 Tiere		Durchschnittlicher Dmax der EDB (mm)/5 Tiere	
Exposition in G ₁ -Phase S-Phase		Exposition in G ₁ -Phase S-Phase		Exposition in G ₁ -Phase S-Phase	
0,02 ± 0,006	n	0,03 ± 0,01	n	0,02 ± 0,004	0,04 ± 0,004
0,02 ± 0,006	s	0,14 ± 0,05	s	0,03 ± 0,003	0,09 ± 0,017
0,16 ± 0,05	n	0,51 ± 0,17	s	0,05 ± 0,006	0,13 ± 0,030
0,74 ± 0,31	s	2,67 ± 0,76	s	0,10 ± 0,005	0,20 ± 0,028
				0,20 ± 0,016	0,27 ± 0,017
				0,24 ± 0,014	0,39 ± 0,023
				0,31 ± 0,012	0,43 ± 0,025
				0,42 ± 0,011	0,53 ± 0,019

s : Die verglichenen Werte sind signifikant verschieden

n : Die verglichenen Werte sind nicht signifikant verschieden.

keine signifikant unterschiedlichen Werte. Bei dem Meßergebnis der Gesamtfläche der EDB und somit auch der prozentualen Gesamtfläche der EDB liegen die Werte der Gruppe S nur bei den Tieren signifikant höher, die vier bzw. neun Monate nach PH getötet wurden. Für die Ergebnisse der durchschnittlichen Fläche der einzelnen EDB ergeben sich vom vierten Monat an durchweg signifikant höhere Werte für die Tiere der Gruppe S. Auffällig dagegen ist, daß die beiden Gruppen in dem Parameter Dmax nur in der Auswertungseinheit vier Monate nach PH deutlich differieren.

1.3 Größenverteilung der EDB in den einzelnen Auswertungseinheiten

Mit Hilfe des "classification"-Programms des Videoplangerätes wurden die Enzymaberrationsherde aller Tiere verschiedenen Größenklassen zugeordnet. Die Histogramme in den Abbildung 13 bis 16 geben die Größenverteilung der EDB zusammengefaßt nach Auswertungseinheiten im Vergleich der beiden Versuchsgruppen wieder.

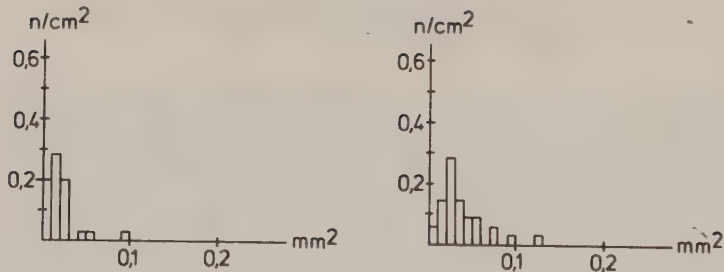


ABBILDUNG 13:

Größenverteilung der ATPase-Defektbezirke/ cm^2 zwei Monate nach Exposition mit DÄNA.

Links: Gruppe G

rechts: Gruppe S

Gruppe G entspricht jeweils den Tieren, die in der G₁-Phase carcinogen-exponiert wurden, Gruppe S entspricht den Tieren, die in der S-Phase carcinogen-exponiert wurden.

Abszisse: Größe der einzelnen Bezirke in einem Steigerungsintervall von 0,01 mm²

Ordinate: Durchschnittliche Anzahl der EDB/cm² Leberschnittfläche

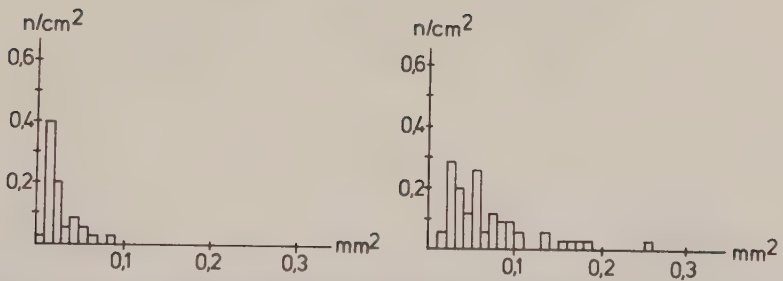


ABBILDUNG 14:

Größenverteilung der ATPase-Defektbezirke/cm² vier Monate nach Exposition mit DANA.

Links: Gruppe G

rechts: Gruppe S

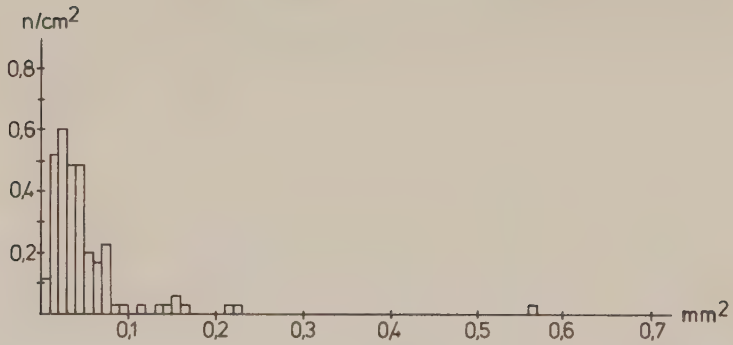


ABBILDUNG 15 a:

Größenverteilung der ATPase-Defektbezirke/ cm^2 in Gruppe G sechs Monate nach Exposition mit DANA.

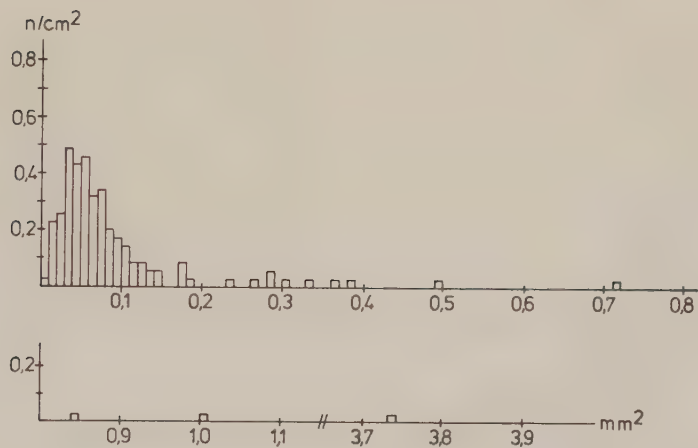


ABBILDUNG 15 b:

Größenverteilung der ATPase-Defektbezirke/ cm^2 in Gruppe S sechs Monate nach Exposition mit DÄNA.

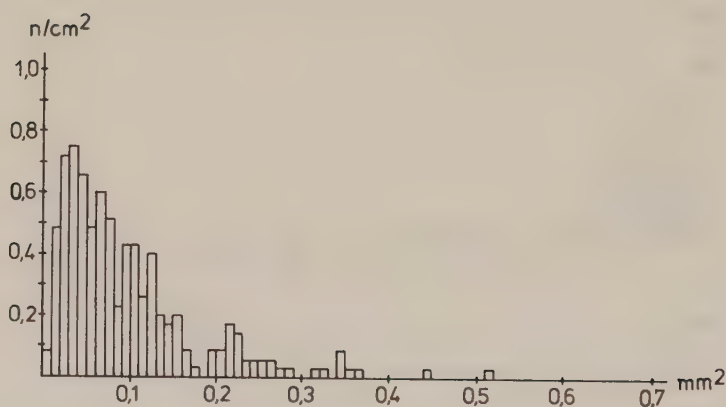


ABBILDUNG 16 a:

Größenverteilung der ATPase-Defektbezirke/cm² in Gruppe G neun Monate nach Exposition mit DÄNA.

Die Histogramme stellen im Prinzip eine Zusammenfassung der Einzelergebnisse in den verschiedenen Parametern (siehe Abbildungen 6 - 10) dar. So sieht man, daß mit steigenden Zeitintervallen nach PH nicht nur vermehrt EDB pro cm² auftreten, sondern gleichzeitig auch größere Herde entstehen. Diese Tendenz zeigt sich in beiden Versuchsgruppen.

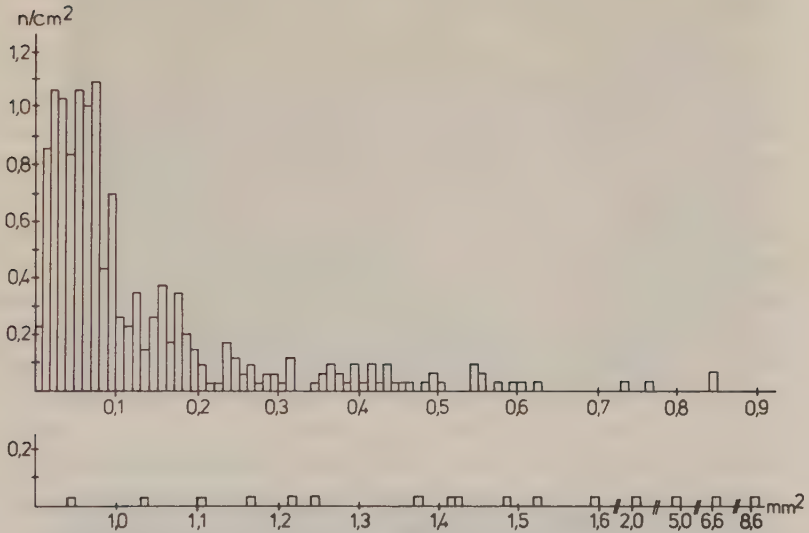


ABBILDUNG 16 b:

Größenverteilung der ATPase-Defektbezirke/cm² in Gruppe S neun Monate nach Exposition mit DÄNA.

Ebenso wird deutlich, daß in allen Auswertungseinheiten der Gruppe S sowohl die durchschnittliche Anzahl der ATPase-Defektbezirke als auch die Größe der einzelnen Herde mehr oder weniger deutlich höher liegt als in den entsprechenden Auswertungseinheiten der Gruppe G.

2 ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN AN SERIENSCHNITTEN

2.1 Vergleich ATPase - Glucose-6-Phosphatase-Reaktion

Beim Vergleich des ATPase-Präparates mit dem konsekutiven Glucose-6-Phosphatase-Schnitt ergab sich in 70 % der Fälle eine völlige Übereinstimmung der ATPase-Defektbezirke mit einem entsprechenden Herd im Glucose-6-Phosphatase-Präparat, und zwar bezüglich der Form und Größe der präneoplastischen Herde sowie der genauen Abgrenzbarkeit vom umgebenden Parenchym. In weiteren 20 % war die Kongruenz nicht ganz eindeutig, da die Glucose-6-Phosphatase-Defektbezirke nur schwach positiv ausfielen bzw. die Grenzen zum umgebenden Gewebe verwaschen waren, so daß diese Herde eventuell auch durch eine unregelmäßige Färbung bedingt sein könnten. Vor allem die kleineren Defektbezirke waren teilweise schlecht abgrenzbar. Nur in 10 % der ATPase-Defektbezirke fand sich keine Andeutung eines Ausfallherdes im entsprechenden Areal des Glucose-6-Phosphatase-Präparats.

Die oben genannten Beobachtungen treffen für Gruppe G und Gruppe S in gleichem Maße zu.

Abbildung 17 zeigt einen ATPase-Defektbezirk mit dem entsprechenden Ausfallbezirk im Glucose-6-Phosphatase-Präparat.

2.2 Vergleich: ATPase-Reaktion - Autoradiographie

Zur Untersuchung einer erhöhten Wachstumsaktivität in präneoplastischen Herden wurde der Markierungsindex in den ATPase-Defektbezirken bestimmt. Dazu wurden im jeweiligen

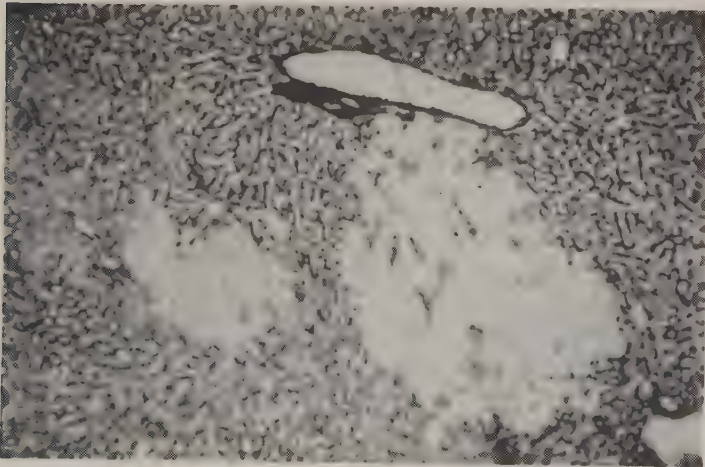
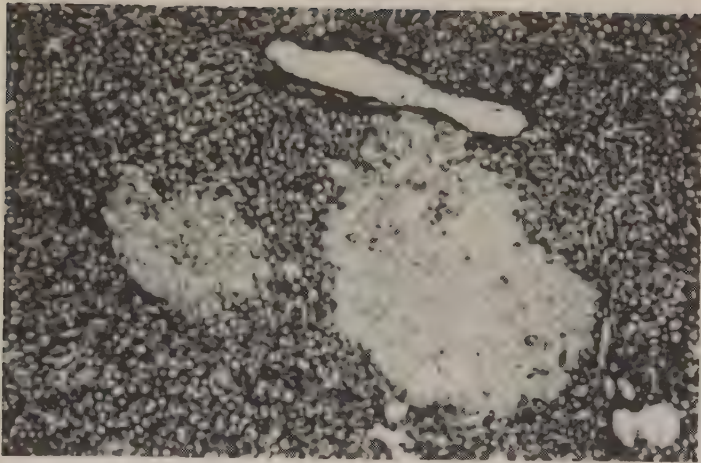


ABBILDUNG 17:

Vergleich einer ATPase-Reaktion (oben) mit dem entsprechenden Ausschnitt aus dem konsekutiven Glucose-6-Phosphatase-Präparat (unten) (Vergrößerung: 100fach).

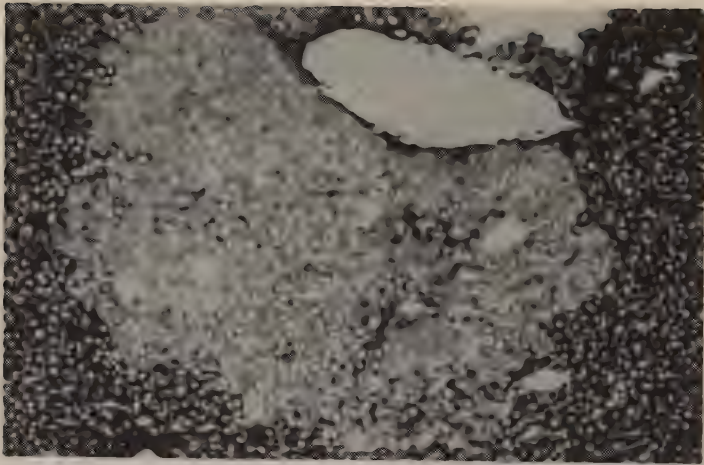


ABBILDUNG 18:

Vergleich einer ATPase-Reaktion (oben) mit dem entsprechenden Ausschnitt aus dem Autoradiogramm derselben Schnittserie (unten) (Vergrößerung: 100fach).

Auch im Autoradiographie-Präparat kann man den EDB schwach im umgebenden normalen Parenchym erkennen an dem helleren Zytoplasma und den teilweise gering vergrößerten Kernen der Zellen.

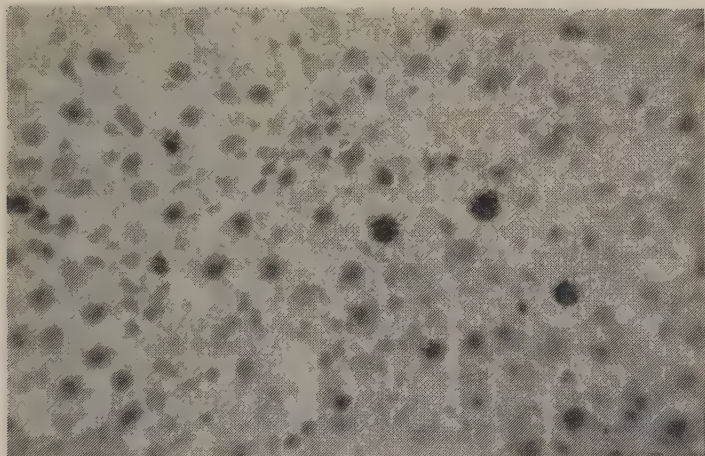


ABBILDUNG 19:

Ausschnitt aus Abb. 18; man erkennt die erhöhte Markierung der Zellen im ATPase-Defektbezirk (Vergrößerung: 400fach).

EDB alle Hepatozyten ausgezählt und die ^3H -Thymidin-markierten Hepatozyten als Fraktion der Gesamtzellzahl ermittelt.

Die durchschnittliche Fläche aller ausgemessenen EDB betrug in Gruppe G $0,11 \text{ mm}^2$ bei einem Maximalwert von $0,53 \text{ mm}^2$, in der Gruppe S ergab sich eine durchschnittliche Fläche der präneoplastischen Herde von $0,13 \text{ mm}^2$ bei einem Maximalwert von $0,69 \text{ mm}^2$. Der Markierungsindex lag in beiden Gruppen im Durchschnitt bei 3 %, wobei vor allem in den größeren Defektbezirken bis zu 6 % markierte Hepatozyten auftraten.

Tabelle 7 zeigt den durchschnittlichen ^3H -Thymidin-Markierungsindex $\pm$ Standardfehler für jedes einzelne Tier.

TABELLE 7:

	Gruppe G	Gruppe S
1	3,2 ± 0,18	3,5 ± 0,21
2	2,8 ± 0,17	2,9 ± 0,15

Übersicht über den durchschnittlichen Prozentanteil ³H-TdR-markierter Zellen ± Standardfehler/ Gesamtzahl der Hepatozyten in 60 ATPase-Defektbezirken pro Tier.

3 BIOLOGISCHER VERSUCH

3.1 Überlebenszeiten und Todesursachen der Tiere des biologischen Versuchs

Die Gruppe G des biologischen Versuchs, die in der G₁-Phase carcinogen-exponiert wurde, bestand aus 26 Tieren. Die Überlebenszeit dieser Tiere lag zwischen 30 und 971 Tagen nach PH bei einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 635 Tagen. Schließt man jedoch die beiden Tiere aus, die bereits 30 Tage nach PH an den Operationsfolgen starben, so ergibt sich eine durchschnittliche Überlebenszeit der übrigen 24 Tiere von 685 Tagen.

Von diesen 24 Tieren fanden sich bei vier Tieren (= 16 %) Tumoren in der Leber. Bei sechs Tieren (= 25 %) wurden Tumoren in der Niere beobachtet, in einem Fall davon beidseits. Lediglich bei einem Tier (= 4 %) trat sowohl in der Leber als auch in einer Niere ein Tumor auf. Der Gesamtanteil tumortragender Tiere in der Gruppe G betrug damit 45 %.

Bei den übrigen Tieren dieser Gruppe war in vier Fällen wegen starker Autolyse bzw. Kannibalismus kein Befund mehr zu erheben. Zwei Tiere waren ohne jeden pathologischen Befund. Die restlichen acht Tiere boten teilweise die Zeichen einer Peritonitis, die Zeichen des Herz-Kreislauf-Versagens oder starben an einer Bronchopneumonie.

Die Gruppe S, die in der S-Phase mit DÄNA behandelt wurde, bestand aus 28 Tieren. Hier überlebten die Tiere die PH durchschnittlich um 587 Tage, wobei die Todeszeitpunkte zwischen 97 und 921 Tagen post PH lagen.

Makroskopisch traten bei insgesamt 16 Tieren (= 56 %) Tumoren auf, die sich aufgliederten in acht Fälle (= 28 %) mit Tumoren in der Leber; bei drei Tieren (10,5 %) fand sich ein einseitiger Nierentumor - in zwei Fällen mit Lungenmetastasen; ein weiteres Tier (3,5 %) zeigte Nierentumoren beidseits, ebenfalls mit Lungenmetastasen; vier Tiere (14 %) boten Tumoren sowohl in der Leber als auch in einer Niere. Auch in dieser Gruppe konnte in vier Fällen wegen starker Autolyse bzw. Kannibalismus kein Befund erhoben werden. Die übrigen acht Tiere der Gruppe S starben ebenso wie die Tiere der Gruppe G überwiegend an einer Bronchopneumonie bzw. einer Peritonitis.

Die folgende Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Tumerverteilung in den beiden Versuchsgruppen.

Tumorlokalisation	Gruppe G		Gruppe S	
	n	%	n	%
Leber	4	16	8	28
Niere(n)	6	25	4	14
Leber und Niere	1	4	4	14
Gesamt	11	45	16	56

TABELLE 8: Übersicht über die Tumerverteilung in den Versuchsgruppen des biologischen Versuchs.

n = Anzahl der tumortragenden Tiere

% = Prozentanteil der tumortragenden Tiere am Gesamtkollektiv von 24 Tieren in Gruppe G bzw. 28 Tieren in Gruppe S.

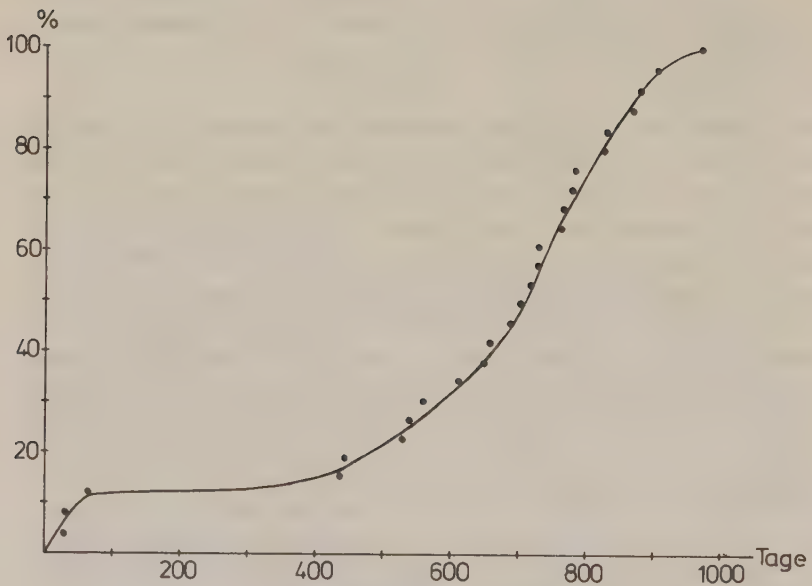


ABBILDUNG 21:

Darstellung der Absterberaten der Tiere der Gruppe G als Funktion der Überlebenszeit nach partieller Hepatektomie.

Abszisse: Überlebenszeit nach Hepatektomie

Ordinate: Kumulation der Absterberaten der Tiere gegen 100 %

Die Ergebnisse des Biologischen Versuchs bestätigen in etwa die Ergebnisse des Hauptversuchs in bezug auf höhere Carcinogensensibilität in Gruppe S im Vergleich zu Gruppe G, wobei der Unterschied zwischen den beiden Gruppen auch hier nicht sehr ausgeprägt ist. So liegt der durchschnittliche Todeszeitpunkt der Tiere der Gruppe S um 98 Tage früher als der in Gruppe G. Dabei nehmen die beiden Kurven der Absterberaten einen nahezu parallelen Verlauf.

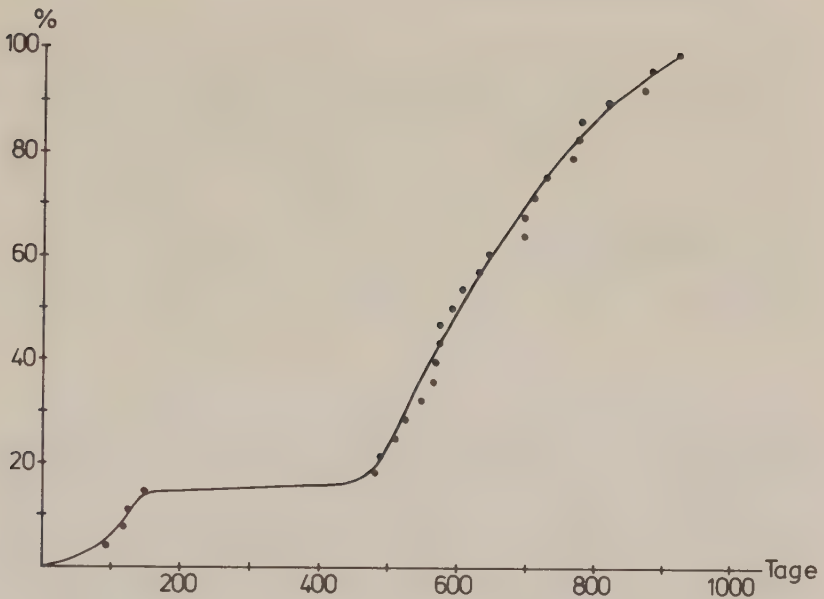


ABBILDUNG 22:

Darstellung der Absterberaten der Tiere der Gruppe S als Funktion der Überlebenszeit nach partieller Hepatektomie.

Abszisse: Überlebenszeit nach Hepatektomie

Ordinate: Kumulation der Absterberaten der Tiere gegen 100 %

Der Prozentanteil tumortragender Tiere liegt mit 56 % ebenfalls in Gruppe S höher als in Gruppe G mit 45 %. Dabei fällt auf, daß der Anteil der Tiere mit einem Tumor der Niere(n) sowohl prozentual als auch absolut in Gruppe G größer ist als in Gruppe S, während die Zahl der kombinierten Leber- und Nierentumore sowie der reinen Lebertumore in Gruppe S höher liegt.

3.2 Histologie der Tumoren

Wegen hochgradiger Autolyse der Präparate konnte keine genaue histologische Auswertung des biologischen Versuchs vorgenommen werden. Soweit noch zu erkennen, handelt es sich bei den Neoplasmen in der Leber in den meisten Fällen um hepatozelluläre Carcinome, während die Befunde in den Nieren am ehesten für Adeno-Carcinome vom gering differenzierten Typ sprechen.

D. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Carcinogenempfindlichkeit von Hepatozyten in der regenerierenden Rattenleber in Abhängigkeit von der Position der Zielzellen im Zellzyklus ermittelt.

Als Auswertungskriterium wurden im Hauptteil der Arbeit ATPase-Defektbezirke untersucht, die als direkte Vorstufe von Carcinomen gelten (Rabes et al., 1972; Kitagawa und Sugano, 1973; Emmelot und Scherer, 1980).

Es ist bekannt, daß Carcinogenbehandlung nur dann zur Tumorentstehung führt, wenn sie auf proliferierendes Gewebe trifft. Diese Tatsache wird besonders deutlich nach künstlich gesetzten Proliferationsreizen wie einer partiellen Hepatektomie. Scherer et al. (1972) konnten damit die Rate an EDB nach einmaliger Gabe von Diäthylnitrosamin auf das Fünf- bis Zehnfache erhöhen.

Dabei fällt die Reaktion der Zellen auf Carcinogenbehandlung in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterschiedlich stark aus. Eine besonders hohe Empfindlichkeit findet sich in der DNS-Synthesephase. So berichten z. B. Craddock und Frei (1974) von einer wesentlich höheren Tumormrate in der Leber bei MNU-Behandlung 24 Stunden nach PH, also in der S-Phase, als bei Carcinogengabe in der G₁-Phase, sechs Stunden nach PH. Auch Columbano et al. (1981) sehen eine gesteigerte Proliferation mit DNS-Replikationen während oder unmittelbar nach Carcinogenbehandlung als wichtige Voraussetzung für die maligne Initiation von Zellen an. Allein bei Emmelot und Scherer (1980) finden sich in etwa gleiche Ergebnisse bei DÄNA-Injektion vier Stunden nach PH = G₁-Phase und 24 Stunden nach PH = S-Phase.

Als Grund für die erhöhte Sensitivität in der S-Phase wird die begrenzte Reparaturkapazität der Zellen angesehen. Nitrosamine, darunter auch Diäthylnitrosamin, führen zur Zellschädigung durch Alkylierung von DNS-Basen (Swann und Magee, 1968). Die Eliminierung und Übertragung des Alkylrestes auf andere Moleküle wird durch ein spezifisches Enzym katalysiert. Die Aktivität dieser Methyltransferase kann induziert werden durch eine allgemeine Proliferationssteigerung der Leber z. B. nach chronischer Carcinogengabe oder nach PH (Montesano et al., 1979; Pegg et al., 1981), zeigt aber bei hohen Carcinogengaben eine schnelle Sättigung.

Grundsätzlich läuft die Elimination des Alkylrestes in der S-Phase schneller ab als in der G_1 -Phase, weshalb der absolute Gehalt an alkylierten DNS-Basen während der S-Phase geringer ist als in den übrigen Zellzyklusphasen. Dennoch reichen die Reparaturprozesse während der S-Phase, wahrscheinlich aufgrund der schnellen Sättigung der Methyltransferase, nicht aus, um den Gehalt an geschädigten Molekülen unter eine gewisse Initiationsschwelle zu bringen, so daß es zur Fixierung der Schäden während der DNS-Replikation kommt. Während der frühen G_1 -Phase - vier Stunden nach PH - ist das Reparaturpotential zwar kleiner, könnte aber unter Normalbedingungen ausreichen, um promotagene DNS-Läsionen bis zum Beginn der S-Phase zu reparieren (Rabes et al., 1982, 1983).

Unsere Befunde des Hauptversuchs können die oben genannten Arbeiten tendenziell bestätigen, wonach präneoplastische Zellpopulationen vermehrt nach carcinogener Exposition während der DNS-Replikation auftreten im Gegensatz zu den übrigen Zellzyklusphasen.

So zeigen in dieser Arbeit die Tiere, die in der S-Phase mit DÄNA behandelt wurden, eine durchschnittlich höhere Inzidenz an EDB im Vergleich zur Gruppe G, d. h., in Gruppe S liegen die Mittelwerte der einzelnen Auswertungseinheiten in allen Parametern höher als in Gruppe G.

Statistisch signifikante Unterschiede ergeben sich dabei zum einen für die Ergebnisse der durchschnittlichen absoluten Gesamtfläche und damit auch der durchschnittlichen prozentualen Gesamtfläche der ATPase-Defektbezirke vier und neun Monate nach PH; zum anderen fanden sich signifikant verschiedene Werte bei dem Parameter der durchschnittlichen Fläche der einzelnen EDB vier, sechs und neun Monate nach PH sowie beim durchschnittlichen maximalen Durchmesser sechs Monate nach Behandlung. In allen übrigen Fällen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden. Besonders bemerkenswert dabei ist, daß sich die durchschnittliche Anzahl der präneoplastischen Herde in keiner Auswertungseinheit signifikant zwischen den beiden Versuchsgruppen unterscheidet.

Bei der Frage nach den Ursachen dieser zunächst nicht erwarteten Ergebnisse müssen Unterschiede in der Behandlung der Tiere im Vergleich zu den Arbeiten der oben genannten Untersucher berücksichtigt werden. Dort wurden die Versuche am nicht-synchronisierten Zellsystem durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch bei allen Tieren eine zehnstündige Hydroxyharnstoff-Infusion durchgeführt, bei den Tieren der Gruppe S, um die Hepatozyten am Übergang von der G_1 - zur S-Phase zu synchronisieren und so mit dem Carcinogen gezielt möglichst viele Zellen in der S-Phase zu treffen, bei den Tieren der Gruppe G, um für beide Gruppen gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen. Diese HU-Behandlung könnte die Reparaturfähigkeit der Zellen in Gruppe G beeinflußt haben. Nitrosaminbehandlung führt zu Einzelstrangbrüchen in der DNS der behandelten Zellen (Bradley et

al., 1982). HU hemmt jedoch die Aktivität der Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase, die für den Aufbau aller vier DNS-Basen benötigt wird (Ockey und Allen, 1975). Aus diesem Grund kommt es während einer HU-Behandlung zur Suppression der semikonservativen DNS-Synthese. Allerdings dürfte der vorhandene Pool einer Zelle an freien Nucleotiden für eine DNS-Reparatursynthese ausreichen. Andererseits hemmt HU auch die Polynucleotidligase, ein Enzym, welches den Strangschluß zwischen der reparierten und der ursprünglichen DNS katalysiert. Somit könnte während der Zellsynchronisation die komplette Reparatur des Genoms ausbleiben und die Zelle permanent geschädigt bleiben. Zwar tritt unter normalen Umständen ein Teil der Hepatozyten bereits 16 Stunden nach PH in die S-Phase ein, so daß eventuelle Schäden am Genom dieser Zellen, die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht repariert werden konnten, fixiert werden, der überwiegende Teil der Hepatozyten folgt jedoch erst gestaffelt nach, so daß an Zellen, die promutagene Läsionen an der DNS tragen, diese Schäden normalerweise bis zu ihrem Eintritt in die S-Phase noch repariert werden können.

Allerdings spielen Strangbrüche nur eine weniger bedeutsame Rolle bei der malignen Initiation von Zellen durch Nitrosamine als die Alkylierung von DNS-Basen. Als wichtigste promutagene DNS-Läsion entsteht dabei das O⁶-Alkylguanin (Rabes et al., 1979; Nagata et al., 1982). Durch die veränderte Struktur des Guanins kann es bei der Chromosomenverdopplung zur falschen Basenpaarung und damit zur Veränderung des Genoms in den Tochterzellen kommen. In der intakten Leber können die meisten dieser alkylierten Basen rechtzeitig bis zur nächsten DNS-Replikation durch die spezifische Methyltransferase repariert werden.

Die HU-Belastung könnte jedoch auch auf andere Weise die Ergebnisse dieser Arbeit beeinflußt haben: Bei den Carcinogenen muß man zwei Arten unterscheiden. Zum einen direkt wirksame "ultimale" Carcinogene, zu denen auch das MNu zählt, welches z. B. in der oben zitierten Arbeit von Craddock und Frei (1974) verwendet wurde, zum anderen Stoffe, die erst nach enzymatischer Aktivierung carcinogen wirken. Zu dieser zweiten Gruppe gehören die Nitrosamine.

Es wäre denkbar, daß eine unmittelbar vorausgehende HU-Infusion die mutagene Wirkung von DÄNA mindert, denn bei gleichzeitiger Gabe besteht zwischen beiden Molekülen eine kompetitive Hemmung in bezug auf ihre metabolisierenden Enzyme (Rabes et al., 1979). Demnach wäre kurz nach Applikation der Wirkstoffspiegel an ultimalem Carcinogen in der Gruppe S niedriger als in Gruppe G. Gerade aber in dieser frühen S-Phase, in der sich die Hepatozyten der Gruppe S unmittelbar nach HU-Infusion befinden, besteht eine besondere Sensitivität der Zellen gegenüber alkylierenden Substanzen, die im Verlauf derselben Zellzyklusphase abnimmt (Rabes, 1983).

Dies könnte eine Erklärung für die im Vergleich zu Gruppe G zu geringe Inzidenz an präneoplastischen Populationen in Gruppe S sein. Einschränkend zu dieser Hypothese muß man sagen, daß die Serumhalbwertszeit von HU nur 80 Minuten beträgt (Rabes et al., 1977). Damit ist es nicht sicher, ob es in diesem Fall überhaupt noch zu einer wesentlichen kompetitiven Hemmung zwischen beiden Substanzen kommt. Außerdem ist es fraglich, ob ein HU-Spiegel, der bereits den Übertritt der Hepatozyten von der G₁- zur S-Phase erlaubt, noch wirksam genug ist, die enzymatische Aktivierung von DÄNA zu unterdrücken.

Carcinogene sind ebenso wie Hydroxyharnstoff in der Lage, die DNS-Synthese zu hemmen und speziell Zellen in der S-Phase zu schädigen (Carver et al., 1979). Diäthylnitrosamin weist zwar bei einer LD 50 von 280 mg/kg Körpergewicht eine große "carcinogene Breite" auf, dennoch ist zu diskutieren, ob, besonders nach einer zusätzlichen vorausgegangenen Belastung der Hepatozyten durch Hydroxyharnstoff, die hier angewandte Dosis von 40 mg DÄNA/kg Körpergewicht bereits zu toxischen Schäden führen kann. Das würde in unseren Versuchen den Verlust der eigentlichen Targetzellpopulation der Gruppe S bedeuten und damit zu einer entsprechend geringeren Rate an EDB bzw. Carcinomen führen, vor allem bei gleichzeitiger kompetitiver Hemmung der carcinogenen Aktivierung von DÄNA.

Wie bereits erwähnt, ist die Aktivität der Methyltransferase dosisabhängig, d. h., je höher die Carcinogendosis, um so langsamer läuft die Reparatur ab (Kleihues et al., 1974). Geht man von einer eventuell zu hohen DÄNA-Dosis in dieser Arbeit aus, so wäre die Folge, daß bei verminderter Alkylierung der Zellen in Gruppe S gleichzeitig eine verminderte Reparatur bereits alkylierter DNS-Basen in Gruppe G abläuft.

Einen entscheidenden Einfluß auf die Ergebnisse dieser Arbeit dürfte auch die Wirkdauer von Diäthylnitrosamin haben, die bei einer Halbwertszeit von 8 Stunden im Vergleich zu anderen heterolytisch aktivierten Carcinogenen wie den Nitrosamiden sehr lang ist (Swann und Magee, 1968). Übertragen auf das hier angewandte Versuchsmodell würde dies bedeuten, daß die Wirkung der Carcinogenexposition in der frühen G₁-Phase bis in den G₁/S-Übergang, also die empfindlichste Phase des Zellzyklus, hineinreicht, während die DÄNA-Behandlung in der S-Phase teilweise erst in der G₂-Phase, also einer wenig sensitiven Zellzyklusphase, zur

Wirkung kommt. Dadurch würden sich die möglicherweise unterschiedlichen Ergebnisse in beiden Versuchsgruppen annähern. Die Verwendung eines kürzer wirksamen und nicht metabolisch zu aktivierenden Carcinogens, wie z. B. Methylnitrosoharnstoff, könnte vom Ansatz her die Aussage dieses Versuchsmodells verschärfen.

Bei der weiteren Diskussion unserer nur teilweise statistisch signifikanten Ergebnisse in den Parametern Anzahl und Gesamtfläche der EDB wäre zu überlegen, ob noch andere Alkylierungsprodukte als O⁶-Alkylguanin bzw. andere Veränderungen an der DNS nach Nitrosaminbehandlung entstehen, die zur Ausbildung von präneoplastischen Populationen führen, deren Existenz aber bisher noch nicht bekannt ist, oder deren Folgen für die Zelle noch nicht untersucht wurden.

Als Zielorgane von Carcinogenen gelten die Gewebe, in denen die Elimination von promutagenen Läsionen langsamer abläuft als in anderen Geweben. Die Leber besitzt jedoch von allen Organen die höchste Kapazität für die Entfernung von O⁶-Alkylguanin. So fanden Kleihues und Margison (1974) nach MNU-Injektion bei Ratten den niedrigsten Gehalt an O⁶-Alkylguanin in der Leber, gefolgt von der Niere, wobei der höchste Wert im ZNS gemessen wurde. Swenberg et al. (1982) fanden beim Vergleich von Leberparenchymzellen mit Nonparenchymzellen einen vier- bis fünfmal höheren Basalwert an Alkyl-Acceptor-Protein für O⁶-Alkylguanin in den Hepatozyten, der nach Carcinogengabe noch um das Zwei- bis Dreifache gesteigert wurde, während der Gehalt an Reparaturenzym in den Nonparenchymzellen im großen und ganzen gleich blieb. Aufgrund dieser großen Reparaturkapazität der Hepatozyten ist es wahrscheinlich, daß andere promutagene Läsionen als O⁶-Alkylguanin wie z. B. O²-Alkylthymine, O⁴-Alkylthymine oder O²-Alkylcytosine für die Induktion von hepa-

tozellulären Carcinomen verantwortlich sind (Swenberg et al., 1982). Diese Möglichkeit wird auch von anderen Untersuchern in Erwägung gezogen (Rabes et al., 1982).

In Anbetracht der oben erwähnten Arbeiten wäre es also denkbar, daß die Ergebnisse dieser Arbeit auch auf andere Veränderungen als O⁶-Alkylguanin zurückzuführen sind, deren Reparaturmechanismen und Induzierbarkeit in Abhängigkeit vom Zellzyklus jedoch noch nicht bekannt sind.

Die oben ausgeführten Überlegungen zu den Befunden des Hauptversuchs werden durch die Ergebnisse des biologischen Versuchs unterstrichen, die in dieselbe Richtung tendieren. Auch hier bestätigt sich anhand des durchschnittlich 98 Tage früher gelegenen Todeszeitpunktes und der höheren Tumorate in Gruppe S eine stärkere Sensitivität der Zellen gegenüber Carcinogenen während der DNS-Synthesephase. Aber auch hier ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei einer Differenz der Tumorfrequenz von 11 % nicht sehr eindrucksvoll. Bemerkenswert dabei ist, daß ein Viertel der Tiere in Gruppe G Nierentumoren aufweist im Vergleich zu nur 14 % in Gruppe S.

Im Gegensatz zur Anzahl und Gesamtfläche der präneoplastischen Herde sind bei der durchschnittlichen Fläche der einzelnen EDB gerade die signifikant verschiedenen Werte zwischen Gruppe S und Gruppe G auffällig. Denn das weitere clonale Wachstum der einmal initiierten Zellen hängt nicht mehr von der Position der Targetzellen im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Carcinogenbehandlung ab, sondern bedarf nun eines allgemeinen Proliferationsreizes, der jedoch in beiden Gruppen die gleiche Wirkung auf die Größe der EDB haben müßte. Damit stellt die Größe der einzelnen EDB ein Maß

für die Promotionswirkung dar. Der Proliferationsreiz kann zum einen durch weitere Carcinogenbehandlung erzielt werden. Dabei übt das Carcinogen einen selektiven Wachstumsreiz auf die initiierten Zellen aus, da diese gegenüber der toxischen Wirkung des Carcinogens resistent geworden sind. Zum anderen kann die Proliferation auch durch sogenannte Promotoren erreicht werden, wie z. B. Phenobarbital, das in dieser Arbeit verwendet wurde (Farber, 1976).

Das Zweistadienkonzept der Carcinogenese in Form von Initiation und Promotion wurde zum erstenmal von Berenblum (1941) am Beispiel der Mäuseepidermis beschrieben und wurde inzwischen auch für die Leber untersucht (z. B. Leonard et al., 1982). Besonders ausführliche Untersuchungen zur Wirkung von Phenobarbital auf die Lebercarcinogenese wurden von Peraino et al. (1971, 1973) und Kitagawa et al. (1979) durchgeführt. So wurde festgestellt, daß Phenobarbital die präneoplastische Latenzphase verkürzt und die Wachstumsrate aller EDB bzw. Tumoren erhöht.

Demnach dürfte sich also kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Größe der einzelnen Herde zwischen Gruppe S und Gruppe G ergeben, wie es jedoch in den vorliegenden Ergebnissen überwiegend der Fall ist. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß in den Präparaten der Gruppe S zum Teil zwei oder mehrere EDB, die dicht beieinanderlagen, in der Latenzzeit konfluieren und so bei der Auswertung als ein einziger Herd imponierten. Dadurch würde sich die Anzahl der EDB scheinbar verringern, während sich für die durchschnittliche Größe der einzelnen Bezirke ein falsch hoher Wert ergeben würde. Diese Möglichkeit wäre für die beiden Auswertungseinheiten sechs und neun Monate nach PH durchaus vorstellbar, da in diesen Präparaten die EDB tatsächlich zum Teil sehr dicht beieinanderlagen. Für die Auswertungseinheit vier Monate nach PH wäre diese Erklärung bei der insgesamt geringen Anzahl an Bezirken eher unwahrscheinlich.

Daß dagegen bei dem Parameter durchschnittlicher maximaler Durchmesser nur in einem Fall ein statistisch signifikantes Ergebnis vorliegt, muß auf technische Fehler beim Umfahren der ATPase-Defektbezirke auf dem Magnettablett zurückgeführt werden. Um diesen Befund zu erklären, müßte es sich bei den EDB in Gruppe G vier und neun Monate nach PH um eher ovale Herde mit relativ kleinem Flächeninhalt handeln, bei der Gruppe S dagegen um eher runde Herde mit relativ großem Flächeninhalt. Dieser Umstand war aber rein vom Aspekt bei der Auswertung der Präparate nicht gegeben.

Es ist zu diskutieren, ob die geringen Unterschiede in der Anzahl und der Gesamtfläche der EDB zwischen Gruppe S und Gruppe G durch die Behandlung der Tiere mit Phenobarbital verursacht wurden. Phenobarbital steigert die Ausprägung von Läsionen, die durch Carcinogene induziert wurden (Peraino et al., 1973). Es wäre vorstellbar, daß sich initiierte Zellen bei den Tieren der Gruppe G, die sonst in ihren normalen Phänotyp revertiert oder in ihrem normalen Phänotyp verblieben wären, unter Phenobarbitalbehandlung zu präneoplastischen Populationen entwickelt haben. So können Promotoren wie Phenobarbital auch dazu benutzt werden, die initiiierende Wirkung von schwachen Carcinogenen aufzuzeigen, die normalerweise nicht zur Ausbildung von Tumoren führen würden (Kitagawa et al., 1979).

Die ausgeprägte promovierende Wirkung von Phenobarbital wird auch in unseren Ergebnissen der Vergleichsfärbungen von Serienschnitten deutlich. Nach einmaliger Gabe von DÄNA im Anschluß an eine PH zeigten nur 5 - 10 % der ATPase-defizienten Herde einen zusätzlichen Verlust an Glucose-6-Phosphatase (Scherer und Emmelot, 1976). Pugh und Goldfarb (1978) erzielten mit einer zusätzlichen Phenobarbitalbehandlung ein breiteres Spektrum an Enzymaberrationen, wobei

vor allem die Defizienz an Glucose-6-Phosphatase mit einem erhöhten Markierungsindex in den EDB korrelierte. Auch unsere Untersuchungen nach elfmonatiger PB-Gabe ergeben mit 70 - 90 % eine hohe Übereinstimmung ATPase- und Glucose-6-Phosphatase-defizienter Herde bei einem erhöhten Markierungsindex von durchschnittlich 3 % in diesen präneoplastischen Populationen.

Neben der inhaltlichen Diskussion unserer Ergebnisse müssen schließlich auch die experimentellen Bedingungen kritisch betrachtet werden. Eine Stichprobenzahl von nur fünf Tieren pro Auswertungseinheit läßt bei der beobachteten großen Streubreite der Einzelwerte keine repräsentativen Ergebnisse erwarten, da die Durchschnittswerte jeder Auswertungseinheit zu sehr von zufälligen "Extremwerten" beeinflusst werden. Diese Durchschnittswerte sowie die Standardabweichung der Einzelwerte gehen beim U-Test, der hier für die Signifikanzbewertung verwendet wurde, in die Berechnungen mit ein. Bei einem vorgegebenen Vertrauensniveau von 95 % hat der U-Test unter diesen Bedingungen nur eine geringe Toleranzbreite, die signifikant verschiedene Ergebnisse zuläßt. Mit steigender Stichprobenzahl nimmt diese Toleranzbreite ebenfalls zu. Um zu verlässlicheren Ergebnissen zu kommen, müßten deshalb die Versuche an einer größeren Zahl von Tieren wiederholt werden.

Außerdem wäre allgemein zu überlegen, ob der Vorteil eines durch Hydroxyharnstoff synchronisierten Systems, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, gegenüber nicht synchronisierten Systemen, nämlich die exakte Abgrenzung der einzelnen Zellzyklusphasen, die gleichzeitigen Nachteile in Form von zusätzlicher toxischer Belastung der Zellen und Beeinflussung der Reparaturkapazität, überwiegt.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die zellzyklusabhängige Wirkung von Carcinogenen wurde in der Literatur mehrfach an in-vitro-Modellen beschrieben. Über in-vivo-Versuche liegen nur wenige Ergebnisse vor. Der Inhalt dieser Arbeit ist die Untersuchung der initiierenden Wirkung von Diäthylnitrosamin auf die Zelle in vivo zu verschiedenen Zellzykluszeiten. Um das hier angewandte System der regenerierenden Rattenleber zellkinetisch besser definieren zu können, wurde die DNS-Synthese-Phase durch eine Hydroxyharnstoff-Vorbehandlung synchronisiert.

Männliche Wistar-Ratten (200 - 225 g) wurden partiell hepatektomiert. 14 Stunden nach der Operation erfolgte eine zehnstündige intravenöse Dauerinfusion von Hydroxyharnstoff zur Synchronisation der Hepatozyten am G₁-S-Übergang des Zellzyklus. Einer Tiergruppe wurde vier Stunden nach partieller Hepatektomie, in der frühen G₁-Phase, Diäthylnitrosamin (40 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Die zweite Gruppe erhielt eine Diäthylnitrosamin-Injektion in gleicher Dosierung unmittelbar nach Absetzen der Hydroxyharnstoff-Infusion, in der frühen DNS-Synthese-Phase. Etwa 36 Stunden nach partieller Hepatektomie wurde ein Spezialfutter mit 0,05 % Phenobarbitalbeimischung zur Promotion der Carcinogenese als Dauerfütterung verabreicht. Zur Bestimmung der Initiationsrate wurden zwei, vier, sechs und neun Monate nach der Behandlung Kryostatsschnitte der Leber von je fünf Tieren beider Gruppen quantitativ-morphologisch nach Anzahl und Fläche darin enthaltener ATPase-Defektbezirke, die als Marker für präneoplastische Populationen gelten, ausgewertet. Um den Phänotyp dieser Populationen näher zu charakterisieren, wurde elf Monate nach der Behandlung an Kryostatserienschnitten der Leber von je zwei Tieren beider Gruppen die Kongruenz zwischen ATPase- und Glucose-6-Phosphatase-defizienten Herden sowie der ³H-Thy-

midin-Markierungsindex in diesen Herden im Maskenvergleichsmikroskop bestimmt. In einem biologischen Zusatzversuch wurden ebenso behandelte Tiere nach ihrem natürlichen Tod seziiert und Inzidenz und Lokalisation von Tumoren registriert.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, daß die Zellen der regenerierenden Leber in der DNS-Synthesephase empfindlicher auf Carcinogenbehandlung reagieren als in der G_1 -Phase: So finden sich bei der Bestimmung der Anzahl präneoplastischer Populationen und der Gesamtfläche dieser Populationen höhere Werte für die in der S-Phase carcinogen-exponierten Tiere im Vergleich zu den in G_1 behandelten Ratten. Wegen der beschränkten Tierzahl sind die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen allerdings nur teilweise statistisch signifikant. Die Ergebnisse des biologischen Versuchs zeigen eine durchschnittlich frühere Mortalität und höhere Tumorzinzidenz bei den Tieren, die in der S-Phase behandelt wurden. In den Serienschnitten ergibt sich bei beiden Versuchsgruppen in 70 % der untersuchten ATPase-defizienten Herde ebenfalls ein Enzymverlust für Glucose-6-Phosphatase bei gleichzeitig erhöhtem ^3H -Thymidin-Markierungsindex in diesen Bezirken.

Im Gegensatz zu in-vitro-Modellen sind die Untersuchungen zur zellzyklusabhängigen Wirkung von Carcinogenen in vivo durch das biologisch komplexere System erschwert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß auch in vivo eine erhöhte Sensitivität von Zellen in der DNS-Synthesephase gegenüber Diäthylnitrosamin im Vergleich zur Exposition in der frühen G_1 -Phase besteht. Eine statistische Absicherung des Ergebnisses würde weitere Versuche erfordern.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Abbott, P.J., Saffhill, R.

DNA-synthesis with methylated poly (dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O⁶-methyl-guanine. Biochim. Biophys. Acta 562, 51 - 61 (1979)

Adams, L.P., Berryman, S., Thomson, A.

Deoxyribonucleoside triphosphate pools in synchronized and drug-inhibited L-/929 cells. Biochim. Biophys. Acta 240, 445 - 462 (1971)

Altmann, H.-W.

Der Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen. Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 15 - 33 (1966)

Bannasch, P., Müller, H.A.

Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von N-Nitrosomorpholin auf die Leber von Ratte und Maus. Arzneimittel-Forsch. 14, 805 - 814 (1964)

Bannasch, Peter

Nitrosamin-induzierte Glykogenese und Geschwulstbildung in der Rattenleber. Verh. Dtsch. Ges. Path. 51, 343 - 349 (1967)

Bannasch, Peter

Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic nodules. Cancer Research 36, 2555 - 2562 (1976)

Bannasch, Peter

Präneoplastische Studien der chemischen Carcinogenese: Zelluläre Vorgänge. Verh. Dtsch. Ges. Path. 63, 40 - 61 (1979)

Bannasch, P., Mayer, D., Hacker, H.J.

Hepatocellular glycogenosis and hepatocarcinogenesis. Biochim. Biophys. Acta 605, 217 - 245 (1980)

Barbason, H., Betz, E.H.

Proliferation of preneoplastic lesions after discontinuation of chronic DEN feeding in the development of hepatomas in rat. Br. J. Cancer 44, 561 - 566 (1981)

Berenblum, Isaac

Sequential aspects of chemical carcinogenesis: Skin. Plenum Press, New York, 1, 323 - 344 (1975)

Bertram, J.S., Heidelberger, C.

Cell cycle dependency of oncogenic transformation induced by N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in culture. Cancer Research 34, 526 - 537 (1974)

Bhuyan, B.K., Fraser, T.J., Gray, L.G., Kuentzel, S.L., Neil, G.L.

Cell-kill kinetics of several S-phase-specific drugs. Cancer Research 33, 888 - 894 (1973)

Bradley, M.O., Dysart, G., Fitzsimmens, K., Harbach, P., Lewin, J., Wolf, G.

Measurements by filter elution of DNA single- and double-strand breaks in rat hepatocytes: Effects of Nitrosamines and γ -irradiation. Cancer Research 42, 2592 - 2597 (1982)

Bucher, Nancy L.R.

Experimental aspects of hepatic regeneration. The New England journal of medicine 13, 686 - 696 (1967)

Cairns, J., Robins, P., Sewdgvick, B., Talmud, P.

The inducible repair of alkylated DNA. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 26, 237 - 244 (1981)

Cameron, R., Kellen, J., Kolin, A., Malkin, A., Farber, E.

γ -Glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis. Cancer Research 36, 823 - 829 (1978)

Carrer, J.H., Hatch, F.T., Branscomb, E.W.

Estimating maximum limits to mutagenic potency from cytotoxic potency. Nature 279, 154 - 156 (1979)

Columbano, A., Rajalakshmi, S., Sarma, D.S.R.

Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures. Cancer Research 41, 2079 - 2083 (1981)

Columbano, A., Ledda, G.M., Rao, P.M., Rajalakshmi, S., Sarma, D.S.R.

Dietary orotic acid, a new selective growth stimulus for carcinogen altered hepatocytes in rat. Cancer Letters 16, 191 - 196 (1982)

Coté, J., Oehlert, W., Büchner, F.
Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese während
der experimentellen Kanzerisierung der Leberparenchymzelle
der Ratte durch Diäthylnitrosamin. Beitr. Path. Anat. 127,
450 - 473 (1962)

Cowdry, E.V.
Problems of aging. Williams & Williams, Baltimore 1942

Coyle, M.B., Strauss, B.
Cell killing and the accumulation of breaks in the DNA of
HEp-2 cells incubated in the presence of hydroxyurea. Cancer
Research 30, 2314 - 2319 (1970)

Craddock, V.M., Frei, J.V.
Induction of liver cell adenomata in the rat by a single
treatment with N-methyl-N-nitrosourea given at various
times after partial hepatectomy. Br. J. Cancer 30, 503 -
511 (1974)

Craddock, V.M. Henderson, A.R.
The activity of 3-methyladenine DNA glycosylase in animal
tissues in relation to carcinogenesis. Carcinogenesis 3,
747 - 750 (1982)

Druckrey, H., Preussmann, R., Schmähl, D., Müller, H.
Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitroso-
aminen. Naturwissenschaften 48, 134 - 135 (1961)

Druckrey, H., Steinhoff, D., Preussmann, R., Ivankovic, S.
Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methyl-
Nitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an
Ratten. Z. Krebsforsch. 66, 1 - 10 (1964)

Druckrey, H., Preussmann, R., Ivancovic, S., Schmähl, D.
Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-
Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Z. Krebsforsch. 69, 103
- 201 (1967)

Emmelot, P., Scherer, E.
The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis.
A quantitative approach. Biochim. Biophys. Acta 605, 247 -
304 (1980)

Enomoto, K., Farber, E.

Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. Cancer Research 42, 2330 - 2335 (1982)

Farber, E.

Biochemistry of carcinogenesis. Cancer Research 28, 1859 - 1869 (1968)

Farber, E.

Hyperplastic areas, hyperplastic nodules, and hyperbasophilic areas as putative precursor lesions. Cancer Research 36, 2532 - 2533 (1976)

Fridman-Manduzio, A., Gol-Winkler, R., Betz, E.H., Goutier, R.

Tumor frequency and characteristics after a single dose of dimethylnitrosamine or diethylnitrosamine in partially hepatectomized rats. Z. Krebsforsch. 90, 13 - 24 (1977)

Friedrich-Frekxa, H., Gössner, W., Börner, P.

Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin. Z. Krebsforsch. 72, 226 - 239 (1969)

Godwin, E.L.R., Rees, K.R., Varcoe, J.S.

Nuclear RNA synthesis in rat liver during the early stages of chemical carcinogenesis. Br. J. Cancer 21, 166 - 173 (1967)

Gössner, W., Friedrich-Frekxa, H.

Histochemische Untersuchungen über die Glucose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Cancerisierung durch Nitrosamine. Z. Naturforsch. 19 b, 862 - 863 (1964)

Goth, R., Rajewsky, M.F.

Persistence of O⁶-ethylguanine in rat-brain DNA: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitroso-urea. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 639 - 643 (1974)

Grisham, J.W.

A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H³. Cancer Research 22, 842 - 856 (1962)

Grundmann, E., Sieburg, H.

Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild. Beitr. path. Anat. 126, 57 - 90 (1962)

Gyenes, M., Ujhelyi, E., Lapis, K., Jeney, A., Schaff, Z., Bencsáth, M.

Investigation of microsomal enzymes in various models of liver carcinogenesis. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 17, 60 (1982)

Hartmann, A., Rabes, H.M.

Die Entstehung praeneoplastischer Läsionen in der Rattenleber nach zweimaliger Karzinogenexposition in spezifischen Phasen des Zellzyklus. Verh. Dtsch. Ges. Path. 66, 503 (1982)

Herren, S.L., Pereira, M.A., Britt, A.L., Khoury, M.K.

Initiation/promotion assay for chemical carcinogens in rat liver. Toxicology Letters 12, 143 - 150 (1982)

Higgins, G.M., Anderson, R.M.

Experimental pathology of the liver; restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Pathol. 12, 186 - 202 (1931)

Hirota, N., Williams, G.M.

The sensitivity and heterogeneity of histochemical markers for altered foci involved in liver carcinogenesis. Am. J. Pathol. 95, 317 - 328 (1979)

Hobik, H.P., Grundmann, E.

Quantitative Veränderungen der DNS und der RNS in der Rattenleberzelle während der Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin. Beiträge zur path. Anat., Bd. CXXVII, 25 - 48 (1962)

Hoffmann, G.

Kurzer Abriß der Anatomie und Physiologie der Laboratoriumstiere. Gustav Fischer Verlag, Jena 1956

Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu, M., Takano, T., Ito, N.

Dose responses of five hepatocarcinogens for the initiation of rat hepatocarcinogenesis. Cancer Letters 14, 279 - 283 (1981)

Iseler, G.

Untersuchungen zur Synchronisation der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung. Dissertation, München 1977

Jones, A.L., Fawcett, D.W.

Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital (with a review on the functions of this organelle in liver). J. Histochem. Cytochem. 14, 215 - 232 (1966)

Kitagawa, T., Sugano, H.

Combined enzymohistochemical and radioautographic studies on areas of hyperplasia in the liver of rats fed N-2-fluorenylacetamide. Cancer Research 33, 2993 - 3001 (1973)

Kitagawa, T.

Sequential phenotypic changes in hyperplastic areas during hepatocarcinogenesis in the rat. Cancer Research 36, 2534 - 2539 (1976)

Kitagawa, T., Sugano, H.

Enhancing effect of phenobarbital on the development of enzyme-altered islands and hepatocellular carcinomas initiated by 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene or diethylnitrosamine. Gann. 69, 679 - 687 (1978)

Kitagawa, T., Pitot, H.C., Miller, E.C., Miller, J.A.

Promotion by dietary phenobarbital of hepatocarcinogenesis by 2-methyl-N, N-dimethyl-4-aminoazobenzene in the rat. Cancer Research 39, 112 - 115 (1979)

Kleihues, P., Margison, G.P.

Carcinogenicity of N-methyl-N-nitrosourea: possible role of repair excision of O⁶-methylguanine from DNA. J. Natl. Cancer Inst. 53, 1839 - 1841 (1974)

Klinge, O., Mathyl, J.

Tageszeitliche Mitose-Rhythmen in der teilektomierten Rattenleber. Virchow Arch. Abt. B Zellpath. 2, 154 - 162 (1969)

Koen, H., Pugh, T.D., Nychka, D., Goldfarb, S.

Presence of alpha-Fetoprotein-positive cells in hepatocellular foci and microcarcinomas induced by single injections of diethylnitrosamine in infant mice. Cancer Research 43, 702 - 708 (1983)

Laib, R.J., Brockes, B., Schwaier, A., Bolt, H.M.
Strain and species differences in the induction of ATPase-deficient hepatic foci by diethylnitrosamine. *Cancer Letters* 15, 145 - 148 (1982)

Leonard, T.B., Dent, J.G., Graichen, M.E., Lyght, O., Popp, J.A.
Comparison of hepatic carcinogen initiation-promotion systems. *Carcinogenesis* 3, 851 - 856 (1982)

Loveless, A.
Possible relevance of O⁶-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* 233, 206 - 207 (1969)

Magee, P.N., Barnes, J.M.
Induction of kidney tumors in the rat dimethylnitrosamine (N-nitrosodimethylamine). *J. Path. Bact.* 84, 19 - 31 (1962)

Magee, P.N., Lee, K.Y.
Cellular injury and carcinogenesis. Alkylation of ribonucleic acid of the rat liver by diethylnitrosamine and N-butylmethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.* 91, 35 - 42 (1964)

Magee, P.N., Pegg, A.E., Swann, P.F.
Molecular mechanisms of chemical carcinogenesis. In *Handb. Allg. Path.*, Band 6, II/6, 329 - 419, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1975

Miller, E.C.
Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential address. *Cancer Research* 38, 1479 - 1496 (1978)

Miller, J.A.
Carcinogenesis by chemicals: An overview - G.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Research* 30, 559 - 579 (1970)

Mölbart, E., Hill, K., Büchner, F.
Die Kanzerisierung der Leberparenchymzelle durch Diäthyl-nitrosamin im elektronenmikroskopischen Bild. *Beiträge zur path. Anat.*, Bd. CXXXVI, 218 - 242 (1962)

Montesano, R., Brésil, H., Margison, G.P.
Increased excision of O⁶-methylguanine from rat liver DNA
after chronic administration of dimethylnitrosamine. Cancer
Research 39, 1798 - 1802 (1979)

Moran, R.E., Straus, M.J.
Cytokinetic analysis of L1210 leukemia after continuous in-
fusion of hydroxyurea in vivo. Cancer Research 39, 1616 -
1622 (1979)

Nagata, C., Takeda, E., Aida, M.
Why O⁶-alkylguanine is specifically promutagenic? Ab initio
molecular orbital consideration. Mutation Research 105, 1 -
5 (1982)

Neidle, S.
Carcinogens and DNA. Nature 283, 135 (1980)

Ockey, C.H., Allen, T.D.
Distribution of DNA or RNA synthesis in mammalian cells
following inhibition with hydroxyurea and 5-fluorodeoxyuri-
dine. Experimental Cell Research 93, 275 - 282 (1975)

Oehlert, W., Hämmerling, W., Büchner, F.
Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der Desoxyribonuclein-
säure-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach
Teilhepatektomie. Beitr. path. Anat. 126, 91 - 112 (1962)

Oehlert, W., Block, P.
Der Mechanismus und zeitliche Ablauf der reparativen Rege-
neration in Geweben mit post- und intermitotischem Zellbe-
stand. Verh. Deutsch. Ges. Path. 46, 333 - 340 (1962)

Oehlert, W., Hartje, J.
Die Veränderungen des Eiweiß-Ribonucleinsäure-Stoffwechsels
der Leberepithelzelle während der experimentellen Canceri-
sierung durch Diäthylnitrosamin. Beitr. path. Anat. 128,
376 - 415 (1963)

Pegg, A.E., Perry, W., Bennett, R.A.
Effect of partial hepatectomy on removal of O⁶-methylgua-
nine from alkylated DNA by rat liver extracts. Biochem. J.
197, 195 - 201 (1981)

Pegg, A.E., Roberfroid, M., von Bahr, C., Foote, R.S., Mitra, S., Bresil, H., Likhachev, A., Montesano, R.
Removal of O⁶-methylguanine from DNA by human liver fractions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5162 - 5165 (1982)

Peraino, C., Fry, M., Staffeldt, E.
Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. Cancer Research 31, 1506 - 1512 (1971)

Peraino, C., Fry, M., Staffeldt, E., Kisieleski, W.E.
Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. Cancer Research 33, 2701 - 2705 (1973)

Peraino, C., Fry, M., Staffeldt, E., Christopher, J.P.
Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. Cancer Research 35, 2884 - 2890 (1975)

Peraino, C., Fry, M., Staffeldt, E.
Effects of varying the onset and duration of exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis. Cancer Research 37, 3623 - 3627 (1977)

Pereira, M.A., Savage jr., R.E., Herren, S.L., Guion, C.W.
Comparison of enhancement of GGTase-positive foci and induction of ornithine decarboxylase in rat liver by barbiturates. Carcinogenesis 3, 147 - 150 (1982)

Perlman, D., Rownd, R.H.
Accumulation of replicating bacterial plasmid DNA during thymine limitation or hydroxyurea treatment. Molec. gen. Genet. 138, 281 - 291 (1975)

Pitot, H.C., Heidelberger, C.
Metabolic regulatory circuits and carcinogenesis. Cancer Research 23, 1694 - 1700 (1963)

Pitot, H.C., Barsness, L., Goldsworthy, T., Kitagawa, T.
Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. Nature 271, 456 - 458 (1978)

Pitot, H.C., Sirica, A.E.

The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 605, 191 - 215 (1980)

Pugh, T.D., Goldfarb, S.

Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rats fed 2-acetylaminofluorene followed by phenobarbital. *Cancer Research* 38, 4450 - 4457 (1978)

Rabes, H.M., Tuczek, H.V.

Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 6, 302 - 312 (1970)

Rabes, H.M., Hartenstein, R., Scholze, P.

Specific stages of cellular response to homeostatic control during diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis. *Experientia* 26, 1356 - 1359 (1970)

Rabes, H.M., Scholze, P., Jantsch, B.

Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient "preneoplastic" liver cell populations in vivo and in vitro. *Cancer Research* 32, 2577 - 2586 (1972)

Rabes, H.M., Wirsching, R., Tuczek, H.V., Iseler, G.

Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet.* 9, 517 - 532 (1976)

Rabes, H.M., Iseler, G., Czichos, S., Tuczek, H.V.

Synchronization of hepatocellular DNA synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of hydroxyurea. *Cancer Research* 37, 1105 - 1111 (1977)

Rabes, H.M.

Proliferative Vorgänge während der Frühstadien der malignen Transformation. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 63, 18 - 39 (1979)

Rabes, H.M., Szymkowiak, R.

Cell kinetics of hepatocytes during the preneoplastic period of diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis. *Cancer Research* 39, 1298 - 1304 (1979)

Rabes, H.M., Carl, P., Meister, P., Rattenhuber, U.
Analysis of proliferative compartments in human tumors, I.
renal adenocarcinoma. Cancer 44, 799 - 813 (1979)

Rabes, H.M., Kerler, R., Wilhelm, R., Rode, G., Riess, H.
Alkylation of DNA and RNA by (^{14}C)dimethylnitrosamine in
hydroxyurea-synchronized regenerating rat liver. Cancer Re-
search 39, 4228 - 4236 (1979)

Rabes, H.M., Bücher, Th., Hartmann, A., Linke, I., Dünn-
wald, M.
Clonal growth of carcinogen-induced enzyme-deficient pre-
neoplastic cell populations in mouse liver. Cancer Research
42, 3220 - 3227 (1982)

Rabes, H.M., Wilhelm, R., Kerler, R., Rode, G.
Dose- and cell cycle-dependent O⁶-methylguanine elimination
from DNA in regenerating rat liver after (^{14}C)dimethylni-
trosamine injection. Cancer Research 42, 3814 - 3821 (1982)

Rabes, H.M., Kerler, R., Wilhelm, R.
DNA alkylation and tumor induction in regenerating rat liv-
er after cell cycle-related continuous N-nitrosodimethyl-
amine infusion. J. Natl. Cancer Inst. 70, 193 - 198 (1983)

Rabes, H.M.
Development and growth of early preneoplastic lesions in-
duced in the liver by chemical carcinogens. Cancer Res.
Clin. Oncol. 106, 85 - 92 (1983)

Rabes, H.M., Müller, L., Hartmann, A., Kerler, R., Schu-
ster, C.
Cell cycle-dependent initiation of adenosine triphosphatase
deficient populations in adult rat liver by a single dose
of N-methyl-N-nitrosourea. Cancer Research 46, 645 - 650
(1986)

Rotstein, L.E., Makowka, L., Lee, G., Farber, E.
The effect of portal diversion on the early stages of liver
carcinogenesis in the rat. Hepatology 2, 67 - 71 (1982)

Rowley, R., Hopkins, H.A., Looney, W.B.
In vivo tumour-cell proliferation after adriamycin treat-
ment. Br. J. Cancer 45, 429 - 437 (1982)

Samson, L., Cairns, J.

A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature* 267, 281 - 283 (1977)

Schauer, A., Kunze, E.

Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin. *Z. Krebsforsch.* 70, 252 - 266 (1968)

Scherer, E., Hoffmann, M., Emmelot, P., Friedrich-Freska, M.

Quantitative study on foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy. *J. Natl. Cancer Inst.* 49, 93 - 106 (1972)

Scherer, E., Emmelot, P.

Kinetics of induction and growth of enzyme-deficient islands involved in hepatocarcinogenesis. *Cancer Research* 36, 2544 - 2554 (1976)

Schmidkonz, P., Hübner, G., Rabes, H.M.

Morphometrische Untersuchungen zur hepatozellulären Hypertrophie bei Hydroxyharnstoff-induziertem "unbalanced growth". *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 61, 473 (1977)

Schoental, R.

The role of nicotinamide and of certain other modifying factors in diethylnitrosamine carcinogenesis. *Cancer* 40, 1833 - 1840 (1977)

Schulte-Hermann, R., Ohde, G., Schuppler, J., Timmermann-Trosiener, I.

Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds, and nafenopin. *Cancer Research* 41, 2556 - 2562 (1981)

Schwartz, H.S., Garofalo, M., Sternberg, S.S., Philips, F.S.

Hydroxyurea: Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating liver of rats. *Cancer Research* 25, 1867 - 1870 (1965)

Shinozuka, H., Lombardi, B., Abanobi, S.E.

A comparative study of the efficacy of four barbiturates as promoters of the development of γ -glutamyltranspeptidase-positive foci in the liver of carcinogen treated rats. *Carcinogenesis* 3, 1017 - 1020 (1982)

Sinclair, W.K.

Hydroxyurea: Effects on chinese hamster cells grown in culture. Cancer Research 27 Part 1, 297 - 308 (1967)

Smith, G.J., Kaufman, D.G., Grisham, J.W.

Decreased excision of O⁶-methylguanine and N⁷-methylguanine during the S phase in 10T1/2 cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 92, 787 - 794 (1980)

Solt, D., Farber, E.

New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. Nature 263, 701 - 703 (1976)

Stäubli, W., Hess, R., Weibel, E.R.

Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes. The Journal of Cell Biology 42, 92 - 112 (1969)

Stöcker, E.

Der Proliferationsmodus in Niere und Leber. Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 53 - 74 (1966)

Stout, D.L., Becker, F.F.

Occurrence of progressive DNA damage coincident with the appearance of foci of altered hepatocytes. Carcinogenesis 3, 599 - 602 (1982)

Swann, P.F., Magee, P.N.

Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethyl-nitrosamine, dimethyl sulphate and methyl methanesulphonate. Biochem. J. 110, 39 - 47 (1968)

Swenberg, J.A., Bedell, M.A., Billings, K.C., Umbenhauer, D.R., Pegg, A.E.

Cell-specific differences in O⁶-alkylguanine DNA repair activity during continuous exposure to carcinogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5499 - 5502 (1982)

Taper, H.S., Fort, L., Brucher, J.M.

Histochemical activity of alkaline and acid nucleases in the rat liver parenchyma during N-nitrosomorpholine carcinogenesis. Cancer Research 31, 913 - 916 (1971)

Thomas, C.

Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte. Z. Krebsforsch. 64, 224 (1961)

Tuczek, H.V., Rabes, H.M.

Autoradiographische Untersuchungen über intralobuläre Differenzen der Flußrate von Hepatocyten in das S-Kompartiment in Frühstadien nach partieller Hepatektomie. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 15, 55 - 63 (1973)

Tuczek, H.V., Skoruppa, W., Rabes, H.M.

Zellkinetische Untersuchungen zur Interferenz zwischen Proliferations- und Funktionsstoffwechsel in der regenerierenden Rattenleber nach Applikation von Phenobarbital. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 17, 347 - 361 (1975)

Wanson, J.-C., de Ridder, L., Mosselmans, R.

Invasiveness of hyperplastic nodule cells from diethylnitrosamine-treated rat liver. Cancer Research 41, 5162 - 5175 (1981)

Warren, W., Lawley, P.D.

The removal of alkylation products from the DNA of Escherichia coli cells treated with the carcinogens N-ethyl-N-nitrosourea and N-methyl-N-nitrosourea: influence of growth conditions and DNA repair defects. Carcinogenesis 1, 67 - 78 (1980)

Watanabe, K., Williams, G.M.

Enhancement of rat hepatocellular-altered foci by the liver tumor promoter phenobarbital: Evidence that foci are precursors of neoplasms and that the promoter acts on carcinogen-induced lesions. J. Natl. Cancer Inst. 61, 1311 - 1314 (1978)

Williams, G.M., Yamamoto, R.S.

Absence of stainable iron from preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver with 8-hydroxyquinoline-induced siderosis. J. Natl. Cancer Inst. 49, 685 - 692 (1972)

Ying, T.S., Enomoto, K., Sarma, D.S.R., Farber, E.

Effects of delays in the cell cycle on the induction of preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver by 1,2-dimethylhydrazine. Cancer Research 42, 876 - 880 (1982)

LEBENS LAUF

Name: Sabina Rink

Geburtsdatum: 14.02.1959

Geburtsort: Hildesheim

Schulausbildung: 1965 - 1968 Grundschule Hildesheim
1968 - 1977 Humanistisches Gymnasium
Andreanum Hildesheim

Studium: WS 77/78 - SS 79 Medizinische Hochschule
Hannover
WS 79/80 - SS 80 Universität Hamburg
WS 80/81 - WS 83/84 Ludwig-Maximilians-Uni-
versität München

Praktisches Jahr: V. Medizinische Abteilung des Städti-
schen Krankenhauses München-Schwabing;
Chirurgische Abteilung des Städtischen
Krankenhauses München-Harlaching;
II. Frauenklinik der Ludwig-Maximili-
ans-Universität im Klinikum Großha-
dern.

Approbation: 20.06.1984

Seit März 1985 als wissenschaftliche
Assistentin am Pathologischen Institut
München
(Vorstand: Professor Dr. M. Eder)

